

微生物由来のシデロホアによる
土壌中セシウムの除染に関する基礎的研究

木村 建貴

第1章 序論

1.1. はじめに	1-1
1.2. 先行研究の概要	1-2
1.2.1. 放射性セシウムの重要性と環境中の放射性セシウム	
1.2.2. 粘土鉱物へのセシウムの吸着	
1.2.3. シデロホアとセシウム溶出現象	
1.2.4. 微生物の影響	
1.3. 本研究の目的と構成	1-8
参考文献	

第2章 シデロホア生産微生物とセシウム溶出現象

2.1. はじめに	2-1
2.2. 実験方法	2-1
2.2.1. 植物根中の微生物の単離	
2.2.2. シデロホア生産能力を有する <i>Pseudomonas</i> 属微生物のスクリーニング	
2.2.3. 粘土鉱物の調整	
2.2.4. シデロホア生産微生物培養液による振とう試験	
2.2.5. シデロホア溶液による振とう試験	
2.3. 結果と考察	2-4
2.3.1. 分離培養とシデロホア生産能力のスクリーニング	
2.3.2. シデロホア生産微生物培養液による振とう試験	
2.3.3. シデロホア溶液による振とう試験	
2.4. まとめ	2-8
参考文献	

第3章 粘土鉱物の違いがシデロホアによるセシウム溶出現象に与える影響

3.1. はじめに	3-1
3.2. 実験方法	3-1
3.2.1. 粘土鉱物	
3.2.2. 人工風化処理	
3.2.3. セシウム吸着試験	
3.2.4. シデロホア溶液による振とう試験	
3.3. 結果と考察	3-3
3.3.1. 粘土鉱物	
3.3.2. 人工風化処理	
3.3.3. セシウム吸着試験	

3.3.4. シデロホア溶液による振とう試験	
3.4. まとめ	3-8
参考文献	
第4章 セシウム濃度がシデロホアによるセシウム溶出現象に与える影響	
4.1. はじめに	4-1
4.2. 実験方法	4-1
4.2.1. 安定同位体セシウムを吸着させた黒雲母の振とう試験	
4.2.2. 放射性セシウムを吸着させた黒雲母の振とう試験	
4.3. 結果と考察	4-2
4.3.1. セシウムの吸着量	
4.3.2. 黒雲母の振とう試験	
4.4. まとめ	4-4
参考文献	
第5章 シデロホアによるセシウム溶出現象のメカニズムの検討	
5.1. はじめに	5-1
5.2. 実験方法	5-1
5.2.1. シデロホアによる錯形成	
5.2.2. 粘土鉱物構成元素の溶出挙動	
5.3. 結果と考察	5-4
5.3.1. シデロホアによる錯形成	
5.3.2. 粘土鉱物構成元素の溶出挙動	
5.3.3. メカニズムの考察	
5.4. まとめ	5-12
参考文献	
第6章 有用なシデロホア生産微生物種の検討	
6.1. はじめに	6-1
6.2. 実験方法	6-1
6.2.1. 土壌中のシデロホア生産微生物の単離	
6.2.2. ホワイトクローバーに共生するシデロホア生産微生物の単離	
6.2.3. 微生物の分類	
6.3. 結果と考察	6-3
6.3.1. 土壌中のシデロホア生産微生物の単離	
6.3.2. ホワイトクローバーに共生するシデロホア生産微生物の単離	

6.3.3. 微生物の分類	
6.4. まとめ	6-16
参考文献	
第7章 粘土鉱物とシデロホア生産微生物の培養試験	
7.1. はじめに	7-1
7.2. 実験方法	7-1
7.3. 結果と考察	7-2
7.3.1. 粘土鉱物とシデロホア生産微生物の培養試験	
7.3.2. HPLC-ICP-OES 測定	
7.4. まとめ	7-9
参考文献	
第8章 シデロホア生産微生物と植物生産物とのシナジー効果	
8.1. はじめに	8-1
8.2. 実験方法	8-1
8.2.1. 植物の生産する有機酸	
8.2.2. 粘土鉱物の調整	
8.2.3. 有機酸添加培地での培養試験	
8.2.4. セシウムを吸着させた粘土鉱物を加えた培養試験	
8.3. 結果と考察	8-3
8.3.1. 植物の生産する有機酸	
8.3.2. 培養試験	
8.4. まとめ	8-9
参考文献	
第9章 結論	
9.1. 本研究で得られた結論	9-1
9.2. 今後の展望	9-3

第1章 序論

1.1. はじめに

2011年に発生した東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所（以後、福島原発とする）で起きた原子力事故（以後、福島原発事故とする）では多くの放射性物質が放出された[1]。環境放出された放射性物質の中でも、放射性セシウムの影響は大きく、事故からおよそ10年が経とうとしている現在でも、その影響は残り続けている。この放射性セシウムは、土壌中の粘土鉱物に強く固定されており、容易に除去できない[2]。そこで、放射性セシウムで汚染された土壌を剥ぎ取る除染方法が広く採用された。しかし、この除染方法の問題点として、発生する放射性廃棄物の量が莫大であること、土壌環境が大きく変化してしまうことが指摘される。これらの汚染土壌の処理方法としては、様々な提案がなされているものの、いずれも高コスト、高環境負荷などが問題となっている。また、森林において除染の必要性が指摘されているものの[3]、面積の広さや費用の観点から除染することは難しい状況である。

放射性セシウムの除染がなされていない場所においては、高濃度のセシウムを含む植物が報告されている[4-9]。放射性セシウムは強く土壌に固定されていることを勘案すると、植物は何らかのメカニズムによって土壌に固定されたセシウムを吸収していると考えられることができる。植物は元素獲得のために有機酸を生産するが、土壌に固定された放射性セシウムの溶出には十分な効果ではない。この点を踏まえると、植物ではない第三者が要因となって放射性セシウムの溶出を促進していることが予想できる。

近年の研究において、粘土鉱物のセシウムの溶出挙動に、微生物の生産物が影響を与えることが明らかにされ[10]、特に第二鉄に強いキレート能力を持つ物質（シデロホア）が着目されている[11, 12]。しかし、シデロホアと粘土鉱物に吸着したセシウムに関しての研究例は少なく[10-12]、詳細は明らかになっていない。植物を用いた低環境負荷の汚染物質原位除去法であるファイトレメディエーションに、シデロホアを応用する研究例は数報のみ存在するが[13, 14]、シデロホアの植物毒性を報告するなど、実際に適用するには課題が多く残っている。シデロホアにより放射性セシウムの溶出が促進される現象は、従来では土壌中で固定されていると考えられていた放射性セシウムが、微生物や植物の恒常的な活動により移行することを示しており、この知見はファイトレメディエーションの開発のみならず、放射性セシウムの環境動態評価や放射性廃棄物の安全管理への応用も期待できる。

本研究は、一部でしか報告のないシデロホアの存在による、粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出現象の詳細を明らかにし、環境中の放射性セシウムのファイトレメディエーションや動態評価に関する基礎的知見を得ることを目的とする。

以下に、本研究に関連する先行研究の概要として、放射性セシウムの重要性と環境中の放射性セシウム、粘土鉱物へのセシウム吸着、シデロホアとセシウム溶出現象、微生物の影響について述べる。

1.2. 先行研究の概要

1.2.1. 放射性セシウムの重要性と環境中の放射性セシウム

放射線はヒトの体内外において影響を与え、放射線障害をもたらす[15]。大気圏内核爆発実験による放射性物質の環境放出は、UNSCEAR2000年レポートによれば、放射性セシウム-137の放出量はおよそ545PBqと見積もられている他、765PBq[16]とも報告されている。大気圏内核爆発実験のほかに、原子力災害事故時においても大量の放射性核種が環境放出される場合がある。1986年4月のチェルノブイリ原子力発電所4号炉で起きた原子力事故（以後、チェルノブイリ原発事故とする）や、2011年3月に起きた福島原発事故では多くの放射性物質が放出された。チェルノブイリ原発事故によって放出された量は、UNSCEAR2000年レポートによると放射性ヨウ素-131が1760PBq、放射性セシウム-137が85PBqと推測されている。福島原発事故では、放射性ヨウ素-131が100～500PBq、放射性セシウム-137が6～20PBqと推測されている[1]。原子力施設の建屋は、放射性物質の閉じ込め機能を有している。この閉じ込め機能が喪失することにより環境中へと放射性物質が放出される。したがって、気体状態などの放射性物質ほど環境放出されやすい。原子力施設で発生する放射性元素のうち、沸点が低いものとしてキセノン(-108°C)やヨウ素(184°C)、セシウム(678°C)が考えられる。放射線防護の観点から、これらのうちヒトへの影響が大きいものは放射性ヨウ素と放射性セシウムである。放射性ヨウ素は、ヒトの甲状腺に集積しやすく、結果甲状腺ガンリスクの上昇につながると考えられる。放射性セシウムはヒトの筋肉に集積しやすく、また放射線のエネルギーも強いためヒトへの影響は考慮すべきである。放射性キセノンは希ガスであるため反応性は低く、また生物学的半減期が短いため影響は小さいと評価できる。一方で、各核種の半減期に注目すると、放射性I-131はおよそ8日で放射性セシウム-134はおよそ2年、放射性セシウム-137はおよそ30年である。これより、放射性ヨウ素-131などの短半減期核種は、崩壊によってすぐに減少するが、放射性セシウム-134および放射性セシウム-137の長半減期核種は崩壊による減少が期待できず、影響が長期化することが懸念される[17,18]。したがって、環境中の放射性セシウムについて、除去法の確立や正確な環境動態評価は非常に重要度の高い課題である。

福島原発事故直後における放射性セシウムの多くは、福島原発を中心として北西方向にフォールアウトした。汚染した森林の66%は森林生態系であった[17]。3月の福島は冬で、広葉樹は散っていたことなどもあり、表層部（リター層やO層）が主なセシウム源となっていた[19]。またフォールアウトしたセシウムのうち、2.1%から12.8%は易交換性として保持されていた[20]。リター層などの表層部に存在していたセシウムは、徐々に土壌へと移行した[21]。チェルノブイリ原発での事故後においても、数十年間は土壌がセシウムを保持し、汚染源となっていた[22]。チェルノブイリ原発事故によりフォールアウトした放射性セシウムで汚染された土壌では、10-21%の放射性セシウムが水および酢酸アンモニウムにより溶出した[23-25]。また、73%は酸による溶出でも脱離しなかった[24]。大気圏核実験フォ

ールアウトに由来する放射性セシウムに関して、福島原発事故以前の青森県内土壌において、酢酸アンモニウムにより溶出する放射性セシウム量は 10%であった[26]。福島原発事故後 5 ヶ月経過した土壌を 1M 塩化アンモニウムで抽出したところ、20-25%の放射性セシウムが溶出し、続いて 1M 酢酸アンモニウム溶液で抽出したところ、2-8%が溶出した[27]。福島原発事故後 2 年経過した土壌からの放射性セシウム溶出量は、4.8-26.5%と土壌によって大きく異なる[2]。

土壌中におけるセシウムは、主として粘土鉱物に吸着する[28]。砂質土壌、グライ土壌、森林土壌、牧草地土壌、および河口シルトの 5 種類に関して、粒径の小さな画分ほど放射性セシウム濃度は高くなり[29]、セシウムの 69-93%が粘土画分 (24-27%) へと吸着している[30]。粘土鉱物が放射性セシウムの吸着に寄与していることは、大気圏核実験フォールアウトに由来する放射性セシウムに関して報告されている[26]。また福島原発事故後の福島県においても、土壌の粘土画分が増加すると、土壌のセシウム保持能力が増加し[20]、特に雲母類などの粘土鉱物の寄与が報告されている[2]。

以上より、環境放出された放射性セシウムは、土壌中の粘土鉱物へと移行し吸着していると考えられる。したがって、粘土鉱物へのセシウムの吸着を考えることは、環境中のセシウムを取り扱う上では、重要なテーマのひとつである。

1.2.2. 粘土鉱物へのセシウムの吸着

放射性セシウムを強く吸着する雲母類などの粘土鉱物は、シート構造物が規則的な配列で重なっている構造を有している (層状粘土鉱物)。粘土鉱物中の原子の一部は同型置換が起こることが知られている。ケイ素がアルミニウムに置換されたり、アルミニウムが鉄やマグネシウムと置換されたりする。同型置換により粘土鉱物全体として電荷の平衡が崩れ、その結果粘土鉱物は負電荷を帯びている状態となる (永久負電荷)。粘土鉱物はカリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウムなどのカチオンによって、電荷のバランスを調整するため、カチオンを吸着する能力を有する。これらの吸着メカニズムは基本的にはイオン交換であり、セシウムともイオン交換することができる[31]。

層状粘土鉱物では、カチオンの吸着サイトは、表面部分、エッジ部分、層間内部の 3 種類が考えられ[32]、セシウムイオンは、これらのサイトへの吸着は線形関係にはならず、選択性があることが報告されている[33]。これには、風化作用によりほつれた粘土鉱物のエッジ部分 (フレイドエッジサイト、FES) が大きく関わっている[34]。イライトや黒雲母は、FES の存在によってカリウムやセシウムの選択性が非常に高くなる[35]ほか、セシウムのイオン交換はカルシウムよりもカリウムのほうが有効である[36]。このような粘土鉱物へのセシウムの吸着に影響を及ぼす要因として、セシウム濃度、粘土鉱物の種類、競合イオン、接触時間が指摘されている[31]。セシウム濃度が低くなるにつれて、セシウムの分配係数は高くなっていく。これは、カチオンの吸着サイト (表面部分、エッジ部分、層間内部) に選択性があることを示している。セシウムの吸着サイトは、実験的には FES と中間的な吸着サ

イト (Type II sites) が観察され[37]、セシウムの吸着モデルの検討も行われている[38]。粘土鉱物の種類に関しては、黒雲母、モスコバイト、普通角閃石は比較的セシウムを吸着する一方で、フルオライト、石英、アパタイト、カルサイト、ギブサイト、マグネタイトなどはほとんど吸着しない[39, 40]。このような鉱物による違いは、カチオン交換容量 (CEC) や BET 比表面積との関連が指摘されているものの、実験系で使用されたセシウム濃度により、関係が変化することもある[31]。カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウムはセシウムと競合しやすく、また、粘土鉱物の層間のカチオンもセシウムとの競合に影響を与える[31]。パーミキュライトにおけるセシウムの吸着は、時間をかけて平衡状態に達する挙動を示す[33]。福島県におけるセシウムの吸着状態は、X線吸収微細構造 (XAFS) 法の一つである広域 X線吸収微細構造 (EXAFS) 分析により、内圏型の表面錯体を形成、すなわち鉱物の持つ酸素原子と直接に結合していることが明らかにされている[41]。一方でカルシウムイオンなどは、セシウムとは異なり、水和状態のまま吸着される (外圏型の表面錯体) [42]。粘土鉱物の構造は、直接的に観察するには非常に小さいため、近年モンテカルロシミュレーション、古典分子動力学法、密度汎関数理論による解明が試みられている[43]。これらにより、表面部分[44]、エッジ部分[45]、フレイドエッジサイト[46-48]、層間内部[48-50]におけるセシウム吸着の詳細が明らかになってきている。

以上より、粘土鉱物へのセシウム吸着を考える上では、セシウムの濃度、粘土鉱物の種類と、それに起因するセシウムの吸着サイトが重要であると言える。一方、粘土鉱物へのセシウム吸着メカニズムについては、実験的な測定には限界があり、近年は計算化学によるシミュレーションを組み合わせることで解明が進められている。

1.2.3. シデロホアとセシウム溶出現象

鉄は地球上で4番目に存在量の多い元素であり、主として、第一鉄 (Fe^{2+}) および第二鉄 (Fe^{3+}) として存在している。鉄の価数の違いは、酸化還元反応において重要であり、そのため多くの生物にとって鉄は必須元素の一つである。環境中における鉄の多くは、酸化第二鉄 (Fe_2O_3) や水酸化第二鉄 ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) の状態で存在しており、水溶態の濃度は非常に小さい ($> 10^{-10}\text{M}$) [51]。そこで、一部の生物は、鉄の取得のためにシデロホア (Siderophore) と呼ばれるキレート剤を生産する[52]。有機酸は鉄とキレートを成すため広義にはシデロホアと考えることができるが、本論文においては有機酸はシデロホアに含まないものとする。シデロホアは、第二鉄との安定度定数が 10^{30} 以上と高く、10 kDa 以下程度の低分子の有機化合物である[53]。シデロホアにより輸送された第二鉄は、細胞内で水溶性の第一鉄に変換され利用される[54]。

シデロホアは、鉄以外の金属に対しても高いキレート能力を有しており (表 1-1)、難溶解性の金属元素の循環を促進するなど、環境中における元素循環に対して重要な役割をなしている[55]。シデロホアであるデフェロキサミン-B (DFOB) は様々な金属イオン (Al, Bi, Ca, Cd, Co, Cu, Ga, In, La, Mg, Ni, Pb, Pu, Sn, Sr, Yb, Zn) とキレートを形成

表 1-1 シデロホアと金属とのキレート形成能力

金属	DFOB	ムギネ酸	Pyoverdine	Pyochelin	微生物シデロホア
Mg	4.3	-	-	-	-
Al	24.14	-	○	-	-
Ca	2.64	3.81	-	-	-
Sc	-	-	-	-	○
V	-	-	-	-	○
Cr	-	-	○	○	○
Mn	-	8.3	-	○	17.3
Fe3+	30.6	-	30.8	-	29.6
Fe2+	-	10.14	9.78	-	8.3
Co	10.31	-	○	○	-
Ni	10.9	14.92	○	○	○
Cu	14.12	18.101	○	○	22.3
Zn	9.55-11.7	12.692	○	○	19.8
Ga	28.17	-	○	-	○
Sr	2.2	-	-	-	-
Mo	-	-	-	-	○
Ag	-	-	○	○	-
Cd	7.88	-	○	○	-
In	20.6	-	-	-	○
Sn	21.14	-	○	-	-
La	10.89	-	-	-	-
Eu	-	-	○	○	-
Tb	-	-	○	○	-
Yb	16	-	-	-	-
Hg	-	-	○	○	-
Tl	-	-	○	○	-
Pb	10	-	○	○	-
Bi	23.5	-	-	-	-
Th	-	-	-	-	○
U	-	-	-	-	○
Pu	30.8	-	-	-	○
Cm	-	-	19.3	-	-

値は logK を表す。また、○はキレートを形成することを表している。

する[56-59]。これらの金属と DFOB のキレート能力（安定度定数）は、金属の第一加水分解定数と相関がある[60]。植物の生産する強力なシデロホアであるムギネ酸も同様、様々な金属（Ca、Cu、Mn、Ni、Zn）とキレートをなす[61]。微生物が生産するシデロホアも、様々な金属イオン（Ag、Al、Cd、Cm、Co、Cr、Cu、Eu、Ga、Hg、In、Mn、Mo、Ni、Pb、Pu、Sc、Sn、Tb、Th、Tl、U、V、Zn）とキレート形成することができる[62-68]。これらの性質は、地球科学的観点から見ると、元素循環の一部を構成し、重要な役割を担っていると考えられる[69]。以上から、シデロホアは、金属に対する高いキレート能力を有しており、難溶解性の金属元素の循環を促進するなど、環境中において元素の循環に関して重要な役割をなしている[55]。

ここで、シデロホアと土壤中のセシウムの関係に着目する。土壤中に固定された放射性セシウムは、そのほとんどが不溶態である[70]。一方で、一部の植物は、放射性セシウムを吸収していることが報告されている[71]。セシウムは、必須元素であるカリウムと水和半径や原子半径が近いことから、植物への吸収において競合すると考えられる[72]。通常、カリウムは土壤中に保持されており、植物は根を通じてカリウムの獲得をしている。土壌と根の界面である根域は、植物や微生物による活動の結果、土壌の諸性質はバルク部分と大きく異なっている[73, 74]。根域でのセシウムの脱離挙動は、バルク部分と比較して異なっている[75]。有機酸は植物や微生物によって生産される。土壌中での存在量や分泌量が比較的多い有機酸である、リンゴ酸、シュウ酸、グリコール酸、クエン酸、マロン酸、酒石酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸の 14 種類に加え、ピルビン酸、オキザロ酢酸、2-ケトグルコン酸、アコニット酸、タンニン酸の 5 種類を合わせた 19 種類の有機酸を用いると、雲母鉱物に吸着した放射性セシウムの一部が溶出する[76]。溶出液における有機酸の濃度が高い場合には、粘土鉱物からのセシウム溶出量は増加する[77]。土壌からのセシウム溶出量は、有機酸のアルミニウムイオンや鉄イオンとの安定度定数が大きなものほど大きくなる[78]。有機酸によってセシウムの溶出量の増加が認められない場合でも、*Bacillus* 属、*Ralstonia* 属、*Enterobacter* 属微生物の培養液によりイライトに吸着したセシウムの溶出量は増加する[10]。Yamaji ら[12]は、福島県において自生する *Eleutherococcus sciadophylloides* から分離したシデロホアを生産する微生物を培養し、その培養液を用いることで土壌中のセシウム溶出量の増加を報告した。また、*Pseudomonas fluorescens* (ATCC17400) が生産するシデロホアは、イライトに吸着したセシウムの溶出量を増加させ、さらにこの微生物由来のシデロホアはキレート効果を持つアセトヒドロキサム酸や DFOB と比較してもセシウム溶出量は高い[11]。しかし、シデロホアによるセシウム溶出量が増加する現象に関しては、詳細なメカニズムの解明には至っていない。通常、粘土鉱物へのセシウム吸着はイオン交換に起因するが[31]、シデロホアによるセシウム溶出現象はイオン交換によらないメカニズムだと指摘されている[11]。シデロホアと粘土鉱物の共存下においては、鉄、ケイ素の濃度が上昇し、鉱物の変質が確認された[14]。しかし、TEM 観察において、明確な違いは確認されなかった[11]。

以上より、シデロホアにより粘土鉱物や土壤に吸着したセシウムの溶出量が増加する現象が報告されており、シデロホアによるセシウム溶出量の増加は、有機酸では効果がない場合においても認められている。しかし、先行研究で検討されている条件は一部の粘土鉱物や土壤のみであり、限定的である。さらに、この現象のメカニズムの詳細はほとんど検討されていない。

1.2.4.微生物の影響

環境中において、微生物は鉱物に作用し、元素循環や土壤の肥沃化、水質の向上などに関する重要な役割を担っており、また、鉱物の変質を促進させている[79-81]。その他にも、鉱物の構造における鉄の還元、凝集、溶解、比表面積、基底間隔、カチオン保持、層電荷、CEC、膨潤、構造変化、安定化などに影響を与えている[82, 83]。このような作用には、鉄の還元やそれに伴う鉱物の溶解が指摘されている[80]。微生物による鉱物の溶解として、スメクタイトの溶解[69]、バーミキュライトの溶解[84]、亜灰長石、アルバイト、カオリナイト、石英の溶解[85]が報告されている。また、*Bacillus cereus*[86]、*Pseudomonas mendocina*[82, 83]はカオリナイトを溶解させ、鉄還元細菌においても、カオリナイトの溶解は起こっている[87]。このように、鉱物中の鉄は、鉱物の溶解と強い関連がある。つまり、セシウムを吸着している鉱物においても、微生物の作用による溶解が起こっていることが考えられる。

シデロホア生産微生物の役割には、植物や微生物との相互作用、植物成長促進微生物(Plant Growth-Promoting Bacteria、PGPB)、病原耐性の付与、金属耐性の付与がある[88]。例えば、ジャガイモの生育量の増加[89]や緑豆の成長促進[90]、病原菌に対する *Pseudomonas* 属微生物の抗菌性[91]などが挙げられる。さらに、植物成長促進微生物としての役割や金属耐性の付与により、重金属を植物に吸収させ除去するファイトレメディエーションへの応用も期待されている[92]。また、微生物自身による金属元素の収着も起こる。*Pseudomonas fluorescens* は、マンガン、鉄、コバルト、銅、亜鉛、ストロンチウム、イットリウム、ジルコニウム、ランタン、セレン、ウランを吸収する[81]。*Pseudomonas fluorescens*(ATCC55241)を用いた実験では、セシウムの蓄積が確認されている[93]。加えて、植物と微生物は密接な関係にあり、植物と共生関係にある微生物も多く存在する[94]。植物-微生物間の共生関係においては、植物由来の有機酸を微生物が活用することでミネラル分の獲得などを行っている。有機酸を炭素源とする培地を用いてシデロホア生産微生物を培養すると、グルコースを炭素源とした場合と比較してシデロホアの生産量が増加する[95]。植物は様々な有機酸を生産するが[96]、微生物はこれらの有機酸を活用することでシデロホア生産能力を高めている可能性がある。

福島県内の植物におけるセシウムの移行係数や濃度が高いことが報告されているが[5, 7]、この理由に関しては明らかになっていない。この点を解明することで、放射性セシウムを除去のためのファイトレメディエーションに応用することが期待できる。さらに、この知見

は、放射性セシウムの環境動態を評価する上でも重要である。シデロホア生産微生物の活動により粘土鉱物に一度固定された放射性セシウムが溶出する現象は、長期的な視点で見ると食物連鎖への取込み量の評価へとつながる。1.2.3. シデロホアとセシウム溶出現象にあるように、微生物の生産するシデロホアは粘土鉱物に固定された放射性セシウムの溶出量を増加させる[10-12]。このようにシデロホアによって溶出したセシウムは植物体にとって可給態であり、シデロホアは植物のセシウム移行係数を増加させることができる[14]。微生物由来のシデロホアによって、イライトに吸着したセシウムの43%が溶出し[11]、このシデロホアを用いることで、セシウム移行係数が福島県内での報告[7]と同程度まで高くなる[14]。以上より、植物の高移行係数に与える微生物の影響は非常に大きいと言える。さらに、シデロホア生産微生物の一部は植物毒性を示しており[13]、シデロホア生産微生物の選定は、無視できない重要な問題である。

1.3. 本研究の目的と構成

本研究は、シデロホアの存在による粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出現象の詳細を明らかにし、環境中の放射性セシウムのファイトレメディエーションや動態評価に関する基礎的知見を得ることを目的としている。具体的には、まず、シデロホアが粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出挙動に与える影響や、それに付随する変化の観察を行う。そして、メカニズムの推定を行い、シデロホア-粘土鉱物間で起こる現象の解明を目指す。次に、シデロホア生産微生物の活動が、粘土鉱物の溶解と粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出挙動に与える影響を改定するために、植物との共生関係、粘土鉱物との相互作用、植物の生産物との相互作用に着目した検討を行う。

本研究目的に対する構成を図 1-1 に示す。第 2 章では、環境中からシデロホア生産微生物を分離し、シデロホアがセシウムの溶出量を増加させる現象が再現できることを確認する。第 3 章においては、粘土鉱物の種類、風化作用が、シデロホアによるセシウム溶出量の増加効果に与える影響に関して評価を行う[97,98]。第 4 章では、吸着したセシウム濃度の違いが、シデロホアによるセシウム溶出量の増加効果に与える影響に関して評価を行う。第 5 章では、シデロホアによるセシウム溶出量の増加効果に関するメカニズムの考察を行う。第 6 章は環境中から分離されるシデロホア生産微生物と植物の共生関係に関する知見の獲得を行う。第 7 章では、シデロホア生産微生物-粘土鉱物間における相互作用の解明を行う。第 8 章では、土壌環境中でのシデロホア生産微生物-粘土鉱物間におけるシナジー効果の解明を試みる[99]。最後に、第 9 章において本研究の結論を示す。

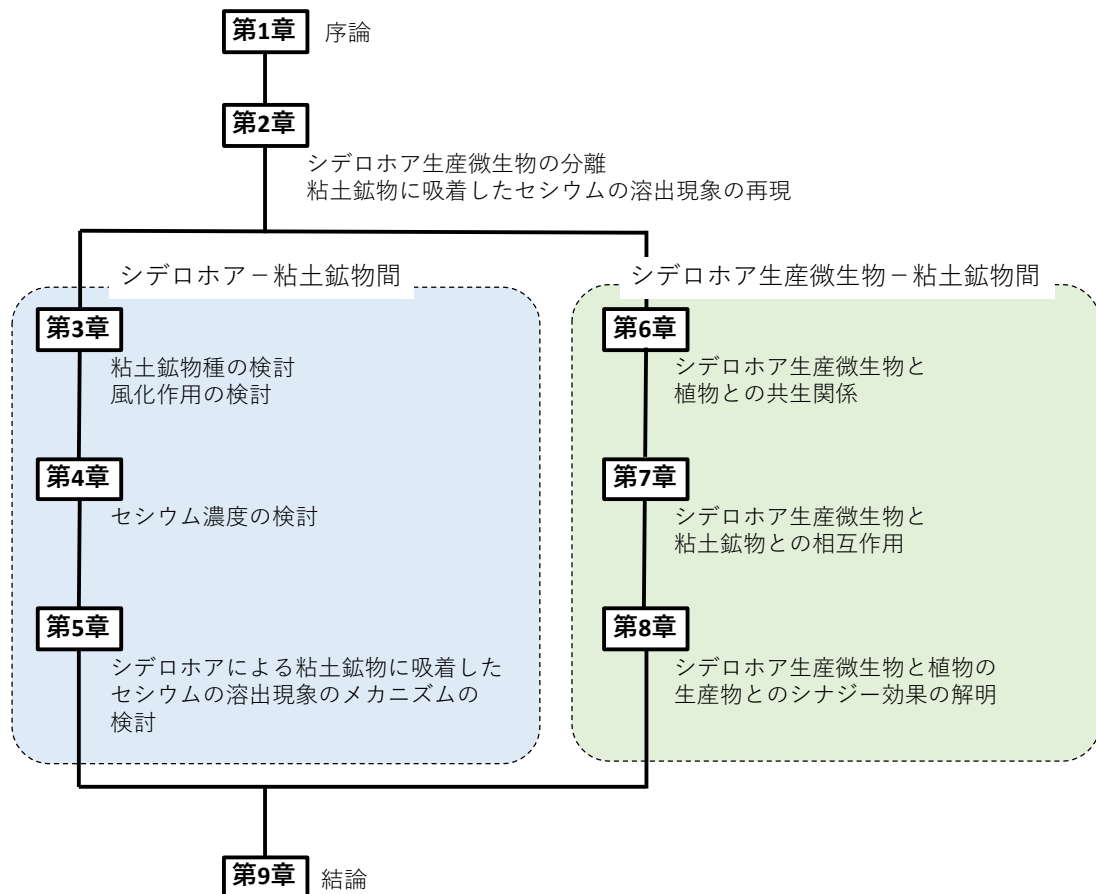


図 1-1 本研究の構成

参考文献

1. IAEA, *The Fukushima Daiichi Accident*. 2015, Vienna: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY.
2. Saito, T., H. Makino, and S. Tanaka, *Geochemical and grain-size distribution of radioactive and stable cesium in Fukushima soils: implications for their long-term behavior*. J Environ Radioact, 2014. **138**: p. 11-8.
3. Taira, Y., et al., *Eight years post-Fukushima: is forest decontamination still necessary?* Journal of radiation research, 2019. **60**(5): p. 705-707.
4. Sasaki, H., S. Sakamoto, and K. Sato, *Accumulation of radioactive cesium released from Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in wild plants grown on grassy plain*. The Natural Environmental Science Research, 2016. **29**: p. 41-47.
5. Cui, L., et al., *Radiocesium concentrations in mushrooms collected in Kawauchi Village five to eight years after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident*. PloS one, 2020. **15**(9): p. e0239296.
6. Tsuchiya, R., et al., *Radiocesium contamination and estimated internal exposure doses in edible wild plants in Kawauchi Village following the Fukushima nuclear disaster*. Plos one, 2017. **12**(12): p. e0189398.
7. Yamashita, J., et al., *Estimation of soil-to-plant transfer factors of radiocesium in 99 wild plant species grown in arable lands 1 year after the Fukushima 1 Nuclear Power Plant accident*. Journal of plant research, 2014. **127**(1): p. 11-22.
8. Sasaki, H., et al., *Accumulation of Radioactive Cesium Released from Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant in Terrestrial Cyanobacteria <i>Nostoc commune</i>*. Microbes and Environments, 2013. **28**(4): p. 466-469.
9. Kiyono, Y. and A. Akama, *Radioactive cesium contamination of edible wild plants after the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant*. Japanese Journal of Forest Environment, 2013. **55**(2): p. 113-118.
10. Wendling, L.A., et al., *Cesium desorption from illite as affected by exudates from rhizosphere bacteria*. Environmental science & technology, 2005. **39**(12): p. 4505-4512.
11. Hazotte, A.A., et al., *Microbial mobilization of cesium from illite: The role of organic acids and siderophores*. Chemical Geology, 2016. **428**: p. 8-14.
12. Yamaji, K., et al., *Root endophytic bacteria of a (137)Cs and Mn accumulator plant, Eleutherococcus sciadophylloides, increase (137)Cs and Mn desorption in the soil*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 112-119.
13. Hazotte, A., et al., *Effect of Pseudomonas fluorescens and pyoverdine on the phytoextraction of cesium by red clover in soil pots and hydroponics*. Environ Sci Pollut

- Res Int, 2018. **25**(21): p. 20680-20690.
14. Péron, O., et al., *Effect of the bacterial pyoverdine siderophore on the phytoextraction of cesium from illite*. Environmental Chemistry Letters, 2018. **17**(1): p. 521-526.
 15. 佐々木 康人, 岡崎 篤, 国際放射線防護委員会 (ICRP) 2007 年勧告への道のり 放射線による健康障害の低減を目指して. 日本原子力学会誌 ATOMOS, 2013. **55**(2): p. 102-105.
 16. Aoyama, M., K. Hirose, and Y. Igarashi, *Re-construction and updating our understanding on the global weapons tests 137 Cs fallout*. Journal of Environmental Monitoring, 2006. **8**(4): p. 431-438.
 17. Hashimoto, S., et al., *Predicted spatio-temporal dynamics of radiocesium deposited onto forests following the Fukushima nuclear accident*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2564.
 18. Schimmack, W., H. Flessa, and K. Bunzl, *Vertical migration of Chernobyl-derived radiocesium in Bavarian grassland soils*. Naturwissenschaften, 1997. **84**(5): p. 204-207.
 19. Koarashi, J., et al., *Factors affecting vertical distribution of Fukushima accident-derived radiocesium in soil under different land-use conditions*. Sci Total Environ, 2012. **431**: p. 392-401.
 20. Koarashi, J., et al., *Retention of potentially mobile radiocesium in forest surface soils affected by the Fukushima nuclear accident*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 1005.
 21. Fujii, K., et al., *Vertical migration of radiocesium and clay mineral composition in five forest soils contaminated by the Fukushima nuclear accident*. Soil Science and Plant Nutrition, 2014. **60**(6): p. 751-764.
 22. Konopleva, I., et al., *Migration and bioavailability of 137Cs in forest soil of southern Germany*. Journal of Environmental Radioactivity, 2009. **100**(4): p. 315-321.
 23. Fawaris, B. and K. Johanson, *Fractionation of caesium (137Cs) in coniferous forest soil in central Sweden*. Science of the total environment, 1995. **170**(3): p. 221-228.
 24. Hou, X.L., et al., *Iodine-129 and Caesium-137 in Chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation*. Science of The Total Environment, 2003. **308**(1-3): p. 97-109.
 25. Riise, G., et al., *A study on radionuclide association with soil components using a sequential extraction procedure*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1990. **142**(2): p. 531-538.
 26. Tsukada, H., et al., *Concentration and specific activity of fallout 137Cs in extracted and particle-size fractions of cultivated soils*. J Environ Radioact, 2008. **99**(6): p. 875-81.
 27. Kozai, N., et al., *Chemical states of fallout radioactive Cs in the soils deposited at Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident*. Journal of Nuclear Science and Technology, 2012. **49**(5): p. 473-478.
 28. Cremers, A., et al., *Quantitative analysis of radiocaesium retention in soils*. Nature, 1988.

- 335(6187): p. 247-249.
29. Livens, F. and M. Baxter, *Particle size and radionuclide levels in some west Cumbrian soils*. Science of the Total Environment, 1988. **70**: p. 1-17.
 30. Gerzabek, M.H., S.A. Mohamad, and K. Muck, *Cesium - 137 in soil texture fractions and its impact on cesium - 137 soil - to - plant transfer*. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1992. **23**(3-4): p. 321-330.
 31. Cornell, R., *Adsorption of cesium on minerals: a review*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1993. **171**(2): p. 483-500.
 32. Bolt, G., M. Sumner, and A. Kamphorst, *A study of the equilibria between three categories of potassium in an illitic soil*. Soil Science Society of America Journal, 1963. **27**(3): p. 294-299.
 33. Sawhney, B., *Kinetics of cesium sorption by clay minerals*. Soil Science Society of America Journal, 1966. **30**(5): p. 565-569.
 34. Sawhney, B., *Selective sorption and fixation of cations by clay minerals: a review*. Clays and clay minerals, 1972. **20**(2): p. 93-100.
 35. Sawhney, B.L., *Potassium and Cesium Ion Selectivity in Relation to Clay Mineral Structure*. Clays and Clay Minerals, 1970. **18**(1): p. 47-52.
 36. Coleman, N.T., D. Craig, and R.J. Lewis, *Ion-Exchange Reactions of Cesium*. Soil Science Society of America Journal, 1963. **27**(3): p. 287-289.
 37. Poinssot, C., B. Baeyens, and M.H. Bradbury, *Experimental and modelling studies of caesium sorption on illite*. Geochimica et cosmochimica Acta, 1999. **63**(19-20): p. 3217-3227.
 38. Bradbury, M.H. and B. Baeyens, *A generalised sorption model for the concentration dependent uptake of caesium by argillaceous rocks*. Journal of Contaminant Hydrology, 2000. **42**(2): p. 141-163.
 39. Torstenfelt, B., K. Andersson, and B. Allard, *Sorption of Sr and Cs on Rocks and Minerals. Part I: Sorption in Groundwater*. Report Prav, 1981. **4**.
 40. Torstenfelt, B., K. Andersson, and B. Allard, *Sorption of strontium and cesium on rocks and minerals*. Chemical Geology, 1982. **36**(1-2): p. 123-137.
 41. Qin, H., et al., *Investigation of cesium adsorption on soil and sediment samples from Fukushima Prefecture by sequential extraction and EXAFS technique*. GEOCHEMICAL JOURNAL, 2012. **46**(4): p. 297-302.
 42. 高橋 嘉夫, et al., *化学種解析に基づく放射性セシウムおよび放射性ヨウ素の移行挙動の理解*. 表面科学, 2013. **34**(3): p. 119-124.
 43. Okumura, M., et al., *Radiocesium interaction with clay minerals: Theory and simulation advances Post-Fukushima*. J Environ Radioact, 2018. **189**: p. 135-145.

44. Loganathan, N. and A.G. Kalinichev, *Quantifying the Mechanisms of Site-Specific Ion Exchange at an Inhomogeneously Charged Surface: Case of Cs⁺/K⁺ on Hydrated Muscovite Mica*. The Journal of Physical Chemistry C, 2017. **121**(14): p. 7829-7836.
45. Lammers, L.N., et al., *Molecular dynamics simulations of cesium adsorption on illite nanoparticles*. J Colloid Interface Sci, 2017. **490**: p. 608-620.
46. Okumura, M., H. Nakamura, and M. Machida, *Mechanism of Strong Affinity of Clay Minerals to Radioactive Cesium: First-Principles Calculation Study for Adsorption of Cesium at Frayed Edge Sites in Muscovite*. Journal of the Physical Society of Japan, 2013. **82**(3).
47. Ruiz Pestana, L., et al., *Direct exchange mechanism for interlayer ions in non-swelling clays*. Environmental science & technology, 2017. **51**(1): p. 393-400.
48. Zaunbrecher, L.K., R.T. Cygan, and W.C. Elliott, *Molecular models of cesium and rubidium adsorption on weathered micaceous minerals*. J Phys Chem A, 2015. **119**(22): p. 5691-700.
49. Ikeda, T., *First-principles-based simulation of interlayer water and alkali metal ions in weathered biotite*. The Journal of Chemical Physics, 2016. **145**(12): p. 124703.
50. Ikeda, T., S. Suzuki, and T. Yaita, *Characterization of adsorbed alkali metal ions in 2: 1 type clay minerals from first-principles metadynamics*. The Journal of Physical Chemistry A, 2015. **119**(30): p. 8369-8375.
51. Boukhalifa, H. and A.L. Crumbliss, *Chemical aspects of siderophore mediated iron transport*. Biometals, 2002. **15**(4): p. 325-339.
52. Albrecht-Gary, A.-M., et al., *Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of Pseudomonas aeruginosa*. Inorganic Chemistry, 1994. **33**(26): p. 6391-6402.
53. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodríguez-Quiñones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiology Reviews, 2003. **27**(2-3): p. 215-237.
54. Ahmed, E. and S.J. Holmstrom, *Siderophores in environmental research: roles and applications*. Microb Biotechnol, 2014. **7**(3): p. 196-208.
55. Müller, B. and G. Défago, *Interaction between the bacterium Pseudomonas fluorescens and vermiculite: Effects on chemical, mineralogical, and mechanical properties of vermiculite*. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2006. **111**(G2).
56. Anderegg, G.v., F. l'Eplattenier, and G. Schwarzenbach, *Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH - Methode*. Helvetica Chimica Acta, 1963. **46**(4): p. 1400-1408.
57. Evers, A., *Metal ion recognition in ligands with negatively charged oxygen donor groups. Complexation of iron (III), gallium (III), indium (III), aluminum (III), and other highly charged metal ions*. Inorg. Chem., 1989. **28**: p. 2189-2195.

58. Hernlem, B.J., L.M. Vane, and G.D. Sayles, *Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations*. Inorganica Chimica Acta, 1996. **244**(2): p. 179-184.
59. Jarvis, N.V. and R.D. Hancock, *Some correlations involving the stability of complexes of transuranium metal ions and ligands with negatively charged oxygen donors*. Inorganica Chimica Acta, 1991. **182**(2): p. 229-232.
60. Hernlem, B.J., L.M. Vane, and G.D. Sayles, *The application of siderophores for metal recovery and waste remediation: examination of correlations for prediction of metal affinities*. Water Research, 1999. **33**(4): p. 951-960.
61. Murakami, T., et al., *Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron (III)*. Chemistry Letters, 1989. **18**(12): p. 2137-2140.
62. Braud, A., et al., *The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity*. J Bacteriol, 2009. **191**(11): p. 3517-25.
63. Braud, A., et al., *New insights into the metal specificity of the Pseudomonas aeruginosa pyoverdine-iron uptake pathway*. Environ Microbiol, 2009. **11**(5): p. 1079-91.
64. Chen, Y., et al., *Stability Constants of Pseudobactin Complexes with Transition Metals*. Soil Science Society of America Journal, 1994. **58**(2): p. 390-396.
65. Hausinger, R.P., *Nickel utilization by microorganisms*. Microbiological reviews, 1987. **51**(1): p. 22-42.
66. Moll, H., et al., *Curium(III) complexation with pyoverdins secreted by a groundwater strain of Pseudomonas fluorescens*. Biometals, 2008. **21**(2): p. 219-28.
67. White, C., S.C. Wilkinson, and G.M. Gadd, *The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1995. **35**(1-3): p. 17-40.
68. Wichard, T., et al., *Role of the Siderophore Azotobactin in the Bacterial Acquisition of Nitrogenase Metal Cofactors*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(19): p. 7218-7224.
69. Kostka, J.E., et al., *The impact of structural Fe (III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1999. **63**(22): p. 3705-3713.
70. Pipíška, M., et al., *Plant uptake of radiocesium from contaminated soil*. Nukleonika, 2004. **49**: p. 9-11.
71. Frissel, M.J., et al., *Generic values for soil-to-plant transfer factors of radiocesium*. Journal of Environmental Radioactivity, 2002. **58**(2): p. 113-128.
72. Zhu, Y.G. and E. Smolders, *Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application*. Journal of Experimental Botany, 2000. **51**(351): p. 1635-1645.

73. Rengel, Z. and P. Marschner, *Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences*. New Phytologist, 2005. **168**(2): p. 305-312.
74. Whalley, W.R., et al., *Structural differences between bulk and rhizosphere soil*. European Journal of Soil Science, 2005. **56**(3): p. 353-360.
75. Wendling, L.A., et al., *Rhizosphere Effects on Cesium Fixation Sites of Soil Containing Micaceous Clays*. Soil Science Society of America Journal, 2005. **69**(5): p. 1652-1657.
76. 小島 懋, et al., *2 : 1 型粘土鉱物に固定されたセシウムの植物による吸収(日本土壌肥料学会 昭和 55 年度大会プログラム)*. 日本土壌肥料学雑誌, 1980. **51**(1): p. 1-7.
77. Wendling, L.A., et al., *Cesium Sorption to Illite as Affected by Oxalate*. Clays and Clay Minerals, 2004. **52**(3): p. 375-381.
78. Chiang, P.N., et al., *Effects of low molecular weight organic acids on (137)Cs release from contaminated soils*. Appl Radiat Isot, 2011. **69**(6): p. 844-51.
79. Mörtel, H. and B. Schmelzer, *Shift of the dehydroxylation temperature of clay according to microbial activity*. Applied Clay Science, 1993. **8**(2): p. 101-109.
80. Mueller, B., *Experimental Interactions Between Clay Minerals and Bacteria: A Review*. Pedosphere, 2015. **25**(6): p. 799-810.
81. Müller, B., *Impact of the bacterium Pseudomonas fluorescens and its genetic derivatives on vermiculite: Effects on trace metals contents and clay mineralogical properties*. Geoderma, 2009. **153**(1-2): p. 94-103.
82. Maurice, P.A., et al., *Dissolution of well and poorly ordered kaolinites by an aerobic bacterium*. Chemical Geology, 2001. **180**(1-4): p. 81-97.
83. Maurice, P.A., et al., *Enhancement of kaolinite dissolution by an aerobic Pseudomonas mendocina bacterium*. Geomicrobiology Journal, 2001. **18**(1): p. 21-35.
84. Berthelin, J. and G. Belgy, *Microbial degradation of phyllosilicates during simulated podzolization*. Geoderma, 1979. **21**(4): p. 297-310.
85. Vandevivere, P., et al., *Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH*. Microbial ecology, 1994. **27**(3): p. 241-251.
86. Štyriaková, I. and I. Štyriak, *Iron removal from kaolins by bacterial leaching*. Ceramics-silikaty, 2000. **44**(4): p. 135-141.
87. Lee, E.Y., K.-S. Cho, and H.W. Ryu, *Microbial refinement of kaolin by iron-reducing bacteria*. Applied Clay Science, 2002. **22**(1-2): p. 47-53.
88. Scavino, A.F. and R.O. Pedraza, *The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria*, in *Bacteria in agrobiolgy: crop productivity*. 2013, Springer. p. 265-285.
89. Kloepper, J.W., et al., *Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria*. Nature, 1980. **286**(5776): p. 885-886.
90. Sharma, A., et al., *Plant growth-promoting bacterium Pseudomonas sp. strain GRP3*

- influences iron acquisition in mung bean (Vigna radiata L. Wilzeck)*. Soil Biology and Biochemistry, 2003. **35**(7): p. 887-894.
91. Gull, M. and F.Y. Hafeez, *Characterization of siderophore producing bacterial strain Pseudomonas fluorescens Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat*. African Journal of Microbiology Research, 2012. **6**(33): p. 6308-6318.
 92. Rajkumar, M., et al., *Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction*. Trends in Biotechnology, 2010. **28**(3): p. 142-149.
 93. Nakao, A., et al., *Cs Accumulation Behavior by Pseudomonas fluorescens*. Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences, 2005. **6**(1): p. 107-110.
 94. Marilley, L. and M. Aragno, *Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of Lolium perenne and Trifolium repens roots*. Applied Soil Ecology, 1999. **13**(2): p. 127-136.
 95. Ferreira, M.L., S.A. Ramirez, and D.L. Vullo, *Chemical characterization and ligand behaviour of Pseudomonas veronii 2E siderophores*. World J Microbiol Biotechnol, 2018. **34**(9): p. 134.
 96. Dakora, F.D. and D.A. Phillips, *Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments*. Plant and Soil, 2002. **245**(1): p. 35-47.
 97. Kimura, T., et al., *EFFECT ON MICROBIAL PRODUCTS ON CAESIUM ELUTION BEHAVIOUR FROM CLAY MINERALS*. Radiation protection dosimetry, 2019. **184**(3-4): p. 385-387.
 98. 木村 建貴, et al., シデロホアによる粘土鉱物中セシウムの脱離現象に関する研究. 土木学会論文集 G (環境), 2018. **74**(7): p. III_503-III_508.
 99. 木村 建貴, et al., 植物が生産する有機酸がシデロホア生産微生物の鉱物溶解促進効果に与える影響. 土木学会論文集 G (環境), 2020. **76**(7): p. III_375-III_382.

第2章 シデロホア生産微生物とセシウム溶出現象

2.1. はじめに

シデロホアを生産する微生物に関して多くの報告があるが、セシウムの溶出に効果があるシデロホアを生産する微生物に *Pseudomonas* 属がある[1,2]。そこで、本研究ではまず、植物根に内生し、シデロホア生産能力を有する *Pseudomonas* 属を分離する。次に、それらの微生物が生産するシデロホアが、粘土鉱物に吸着させたセシウムの溶出に影響を与えるのかに関して、セシウムを吸着させた粘土鉱物をシデロホア溶液で振とうすることで実験的に検討する。

2.2. 実験方法

2.2.1. 植物根中の微生物の単離

ホワイトクローバー (*Trifolium repens*) を研究に用いる植物として選定した。クローバーは牧草として栽培されることもあり、入手及び育成が容易であり、また、生命力が強く環境適応能力は高い。日本では帰化植物となっているため、環境負荷はないと考えられる。さらに、クローバーは、植物中セシウム濃度[$\mu\text{g-Cs/g-shoot}$]と土壌中セシウム濃度[$\mu\text{g-Cs/g-soil}$]の比が9.36–11.2と報告されており[3]、セシウム蓄積能力を有している。さらに、先行研究においても使用されており[4,5]、比較が容易となる。

サンプリングは京都大学複合原子力科学研究所敷地内にある中央観測所前の試料作物用畑の横で行った。クローバーが群生している箇所から4個体を選んだ(クローバー1、クローバー2、クローバー3、クローバー4)。各個体を傷つけないよう、深さ15cm程度を土壌ごとサンプリングした。その後土壌部分をほぐし、根の周囲の土壌を落とした。水道水で満たした容器に個体を入れて、根の周囲の土壌を全て落とした。この洗浄操作を数回繰り返したのち、最後に超純水で数回洗った(図2-1)。

植物根表面の滅菌方法は先行研究[6]を一部変更して行った。ホワイトクローバーの根を70%エタノールに1分間浸し、根の表面に付着した油など



図 2-1 洗浄後のホワイトクローバー試料

の汚れを落とした。次に、ホワイトクローバーの根を 7.5%過酸化水素水に移し、5 分間滅菌した後、70%エタノールで 1 分間滅菌処理を施した。最後に滅菌水で約 5 分間、根をすすいだ。滅菌処理した根を切断して作成した植物根切片を、1% NBA 寒天培地 (2% 寒天)、1% TSA 寒天培地 (2% 寒天) で培養した。これらの培地は、栄養要求性の高くない一般的な微生物の培養に用いられる培地であり、先行研究[2]において使用されている。1 個体からそれぞれ 100 切片ずつ (NBA 培地 50 切片、TSA 培地 50 切片)、4 個体分計 400 切片を用意した。これらを 23°C 暗条件下で 20 日間培養した。培地上に出現したコロニーを新しい同一培地上に継代し、微生物を単離した。

2.2.2. シデロホア生産能力を有する *Pseudomonas* 属微生物のスクリーニング

単離した微生物は、NAC (Nalidixic Acid Ceftrimide) 培地、キング培地 (キング A 培地、キング B 培地) で培養することで *Pseudomonas* 属のスクリーニングを行った。これらの培地は、*Pseudomonas* 属の選択培地として広く用いられている培地である。NAC 培地に塗抹した微生物は、37°C で 18~24 時間培養した。キング A 培地に塗抹した微生物は、37°C で 1 夜培養し、その後 23°C で 6 日間培養した。キング B 培地に塗抹した微生物は、37°C で 6 日間培養した。続いて、シデロホア生産能力のスクリーニングを実施した。スクリーニングは CAS 寒天培地を使用した[7, 8]。CAS 寒天培地は、シデロホアの生産性の有無を視覚的に確認できる培地であり、シデロホアの生産性の確認には最も一般的な培地である。滅菌した 1 mM NaCl 水溶液で微生物濃度を 10⁶ CFU/mL に希釈し、微生物懸濁液 10 µL を CAS 培地上にマイクロピペットで滴下し、23°C 暗条件下で 7 日間培養した。CAS 寒天培地は青色であるが、シデロホアの存在により青色部分が脱色されるかオレンジ色になる。シデロホア生産能力は、微生物コロニーの大きさ (コロニー円) と、微生物の生成するシデロホアの存在により脱色された部分 (シデロホア円) の比によって評価した[2]。

CAS 寒天培地にてシデロホア生産能力を有することがわかった微生物を、50% TSB 培地 15 mL で 12~18 時間、25°C で培養した。その後 0.5% CAA (Casamino Acid) 培地 300 mL に移し替え、4~5 日間培養した[9]。培養後、0.45 µm ろ紙を用いて濾過した。溶液中のシデロホア量を定量するために、シデロホア溶液 1 mL に CAS solution[8] 1 mL と 0.2 M 5-スルホサリチル酸溶液を 20 µL 添加し、30 分後に 630 nm における吸光度を吸光度計 (日本分光株式会社、V-570) で測定し定量した[8]。なお定量に際し、標準物質として DFOM (Deferoxamine Mesylate) を用いた。

2.2.3. 粘土鉱物の調整

粘土鉱物は黒雲母 (株式会社キララ) と園芸用バーミキュライト (株式会社プロトリーフ) を用いた。粘土鉱物試料は自動乳鉢にて粉碎し、ふるい目 75 µm (200 メッシュ) を通過したものをを用いた。これらの粘土鉱物は 100 mM および 1 mM NaCl 溶液で洗浄し、最後に 1 mM NaCl 溶液を加え、NaCl 溶液に対する粘土鉱物濃度が 10 g/L となるように調整した。

セシウム含有量を測定するため、粘土鉱物試料 50 mg を硝酸 3 mL、塩酸 3 mL、ほうフッ化水素酸 4 mL でマイクロウェーブ分解を行い全溶解した。この溶液中のセシウムを ICP-MS (Analytic Jena 社、PlasmaQuant MS) で測定した。その後、91 mM および 9.1 mM CsCl 溶液 200 μ L を粘土鉱物を含む懸濁液 20 mL に加えることで、バッチ形式で粘土鉱物に異なる 2 つの濃度のセシウムを吸着させた。24 時間後に溶液をサンプリングし、0.45 μ m シリンジフィルターでろ過後にセシウム濃度を ICP-MS で測定することにより、粘土鉱物へのセシウム吸着量を求めた。セシウム吸着後、粘土鉱物は 1 mM NaCl で数回洗浄し、10 g/L となるように 1 mM NaCl 溶液を加えた。

2.2.4. シデロホア生産微生物培養液による振とう試験

微生物は、2.2.2.にてシデロホア生産量が多い 3 種類 (NC4-35、TC3-43、TC4-8; 2.3.1. 及び表 2-2 参照) を用いた。2.2.2.にて得られた培養液のろ液のシデロホア濃度は 50 μ M に調整した。この濃度は土壤中で確認されている濃度である [10]。この培養液 20 mL にセシウムを吸着させた粘土鉱物を含む懸濁液 200 μ L を加え、14 日間振とうした (n=1)。振とう後、0.45 μ m シリンジフィルターでろ過し、ろ液 1mL を 350°C のホットプレートで加熱し、水分を蒸発させた。水分の蒸発後に濃硝酸 5mL を加え再度加熱し、含まれる有機物を分解した。サンプルと洗浄液を回収し、含まれるセシウム量を ICP-MS で測定した。ブランク試験は滅菌した CAA 培地を用いて行った。

2.2.5. シデロホア溶液による振とう試験

本研究では、先行研究 [1] を参考に 2.2.2.で培養した培養液中のシデロホアの精製を行った。培養液に 3% トリクロロ酢酸を 100mL 加えタンパク質を固定した。その後培養液を遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m ろ紙を用いてろ過した。ろ液の pH を 7.0 に調整したのち、シデロホアを含む画分を Amberlite® XAD-4 (Sigma Aldrich 社) 樹脂に吸着させた。XAD-4 樹脂を取り出し、メタノールおよび 50%メタノール水溶液で洗浄し、シデロホアを脱離させた。エバポレーターを用いてメタノールを除去した。除去後の溶液中のシデロホア量は、2.2.2.で示した方法と同様の方法で定量した。

振とう試験には、2.2.2.にてシデロホア生産量が多い微生物 (NC4-35、TC3-43、TC4-8) の培養液から精製したシデロホア溶液を用いた。セシウムを吸着させた粘土鉱物を含む懸濁液 200 μ L (粘土鉱物 2 mg) に、50 μ M シデロホア溶液 20 mL を加え、振とうさせた (n=3)。シデロホア溶液を加えてから 30、60 分後および 1、2、7 日後に懸濁液 1 mL をサンプリングし、0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した。ろ液中のセシウム濃度を ICP-MS で測定した。なお、ブランク試験として、TSB 培地と CAA 培地の混合液 (pH=7.0) にシデロホア精製プロトコルで行った操作を加えた溶液を用いた。

2.3. 結果と考察

2.3.1. 分離培養とシデロホア生産能力のスクリーニング

NBA 培地からは計 238 株、TSA 培地からは計 222 株が分離できた (表 2-1)。これらの微生物にナンバリングを施した。例えば、NBA 培地で分離培養したクローバー1 の微生物株は「NC1-●」、TSA 培地で分離培養したクローバー2 の微生物株は「TC2-●」などと表記する。これら 460 株について行った *Pseudomonas* 属のスクリーニング (NAC 培地、キング A 培地、キング B 培地) の結果、*Pseudomonas* 属と考えられるものを表 2-2 に示す。*Pseudomonas* 属のスクリーニングの結果、NBA 培地では 37 株、TSA 培地 35 株の合計 72 株について陽性反応が確認できた。

Pseudomonas 属のスクリーニングで陽性を示した 72 株について、CAS 寒天培地によるシデロホア生産能力のスクリーニング試験を行った。微生物のコロニー円とシデロホア生

表 2-1 分離培養の結果

分離培地	クローバー 1	クローバー 2	クローバー 3	クローバー 4	合計
NBA 培地	82	46	56	54	238
TSA 培地	54	60	56	52	222

表 2-2 *Pseudomonas* 属の簡易同定の結果

クローバー	サンプル数	該当株	陽性数
NBA 培地	1	NC1- <u>6, 18, 22, 53, 74, 77, 78, 82</u>	8
	2	NC2- <u>2, 9, 11, 12, 18, 22, 25, 30, 41, 46</u>	10
	3	NC3- <u>10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 24, 36, 39, 43, 44, 46, 47</u>	16
	4	NC4- <u>34, 35, 36</u>	3
TSA 培地	1	TC1- <u>3, 9, 11, 14, 16, 19, 35</u>	7
	2	TC2- <u>12, 23, 49, 50</u>	4
	3	TC3- <u>9, 10, 12, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 35, 36, 38, 43, 44, 47, 53</u>	17
	4	TC4- <u>6, 7, 8, 9, 10, 22, 39</u>	7

下線 () は複数の陽性反応があったことを表す。

表 2-3 CAS-assay の結果

	シデロホア円 [mm]	コロニー円 [mm]	CAS Score
NC3-	17	38.175	2.349
	34	36.55	2.031
NC4-	35	49.8	2.000
	36	37.75	2.041
	12	43	2.194
TC3-	38	35	2.258
	43	49.35	2.449
	6	44.5	2.781
TC4-	8	38.65	2.003
	9	44	2.515
	10	35	2.050

成に起因する円（シデロホア円）の比を CAS score と定義する（式 2-1）。本研究では、微生物の濃度を 10^6 CFU/mL に揃えてはいるものの、コロニー円の大きさも含めた基準である CAS score を用いてシデロホアの生産能力を評価した。結果は図 2-2 に示す[11]。

$$CAS\ score = \frac{\text{シデロホア円直径 [mm]}}{\text{コロニー円直径 [mm]}}$$

…（式 2-1）

CAS score が 1.0 以上であれば、シデロホア生産微生物だと考えられ、CAS score が大きくなるにつれて、シデロホア生産能力が大きくなると考えられる。CAS score が 2.0 以上のものを表 2-3 に示す。

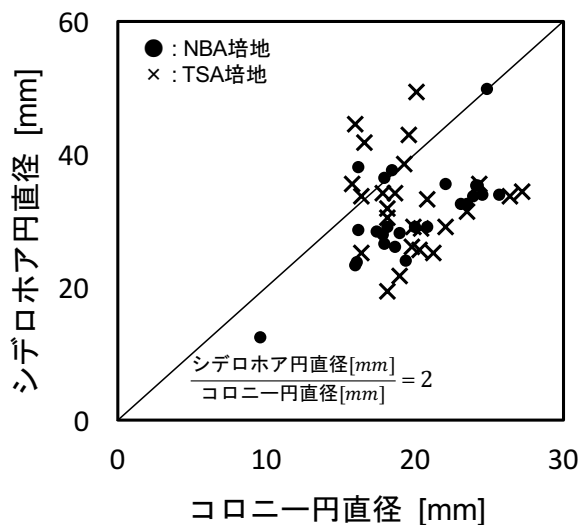


図 2-2 CAS assay の結果（CAS Score）

2.3.2. シデロホア生産微生物培養液による振とう試験

全溶解試験の結果、各粘土鉱物のセシウム含有量は、バーミキュライトが 22.1 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ であり黒雲母が 4.9 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ であった。これらに 2 つの異なる濃度のセシウムをバッチ形式により吸着させた。吸着したセシウム量はそれぞれバーミキュライトが 5100 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ と 920 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ 、および黒雲母が 2300 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ と 520 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ となった。添加したセシウムの量と比較して、粘土鉱物中にもともと含まれているセシウムの量はわずかである。

シデロホア生産微生物培養液によるセシウム振とう試験の結果を図 2-3 に示す。各条件における最大溶出率の増加は、5100 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ および 920 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ バーミキュライトでは 2.5 ポイント (TC4-8) および 2.6 ポイント (TC3-43)、2300 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ および 520 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ 黒雲母では 1.9 ポイント (TC4-8) および 3.2 ポイント (TC3-43) であった。120 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ および 16 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ のセシウムが添加されたイライトを用いた先行研究では、微生物の生産物によってセシウム溶出量が有意に増加し、その差はおおよそ数から 10 mmol-Cs/kg 程度であった[12]。本研究で単離された微生物において、いくつかの

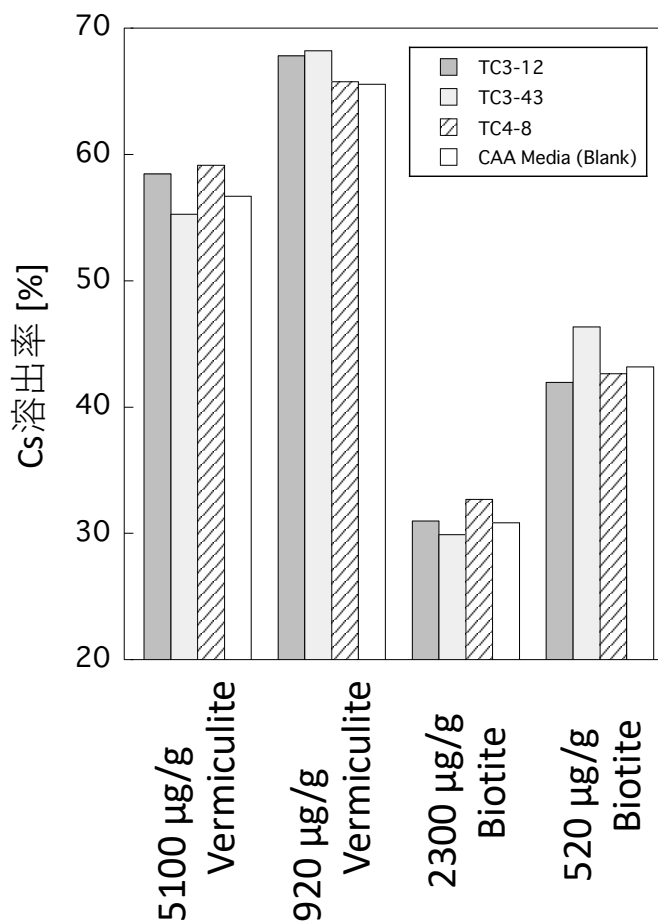


図 2-3 微生物培養液を用いた振とう試験の結果

表 2-4 TC4-8 とブランク試験における溶出率の検定

Cs 吸着量[$\mu\text{g-Cs/g-clay}$]	バーミキュライト		黒雲母	
	5100	920	2300	520
t 値	6.78	18.3	7.28	8.46
p 値	0.021	<0.01	<0.01	<0.01

微生物において溶出量の増加が認められた。Yamaji ら [2] は、シデロホアを生産する *Pseudomonas* 属微生物である *Pseudomonas denitrificans*、*Pseudomonas citronellolis* の培養液を用いた場合、土壌からの放射性セシウムの溶出濃度が数 Bq/g 増加することを報告した。これらの報告と、本研究にて単離された 3 種類の微生物 (NC4-35、TC3-43、TC4-8) の培養液による振とう試験の結果は類似している。

2.3.3. シデロホア溶液による振とう試験

シデロホア溶液による粘土鉱物の振とう試験の結果を図 2-4 に示す [11]。各微生物の溶出率で最も大きな値は、5100 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ バーミキュライトでは 52.7–62.2%，920 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ バーミキュライトで 58.1–66.9%、2300 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ 黒雲母で 31.9–32.6%、520 $\mu\text{g-Cs/g-clay}$ 黒雲母で 41.4–47.0% であり、バーミキュライトの方が黒雲母よりも溶出率が高い傾向がある。溶出率について検定を行ったところ、いずれの粘土鉱物においても、TC4-

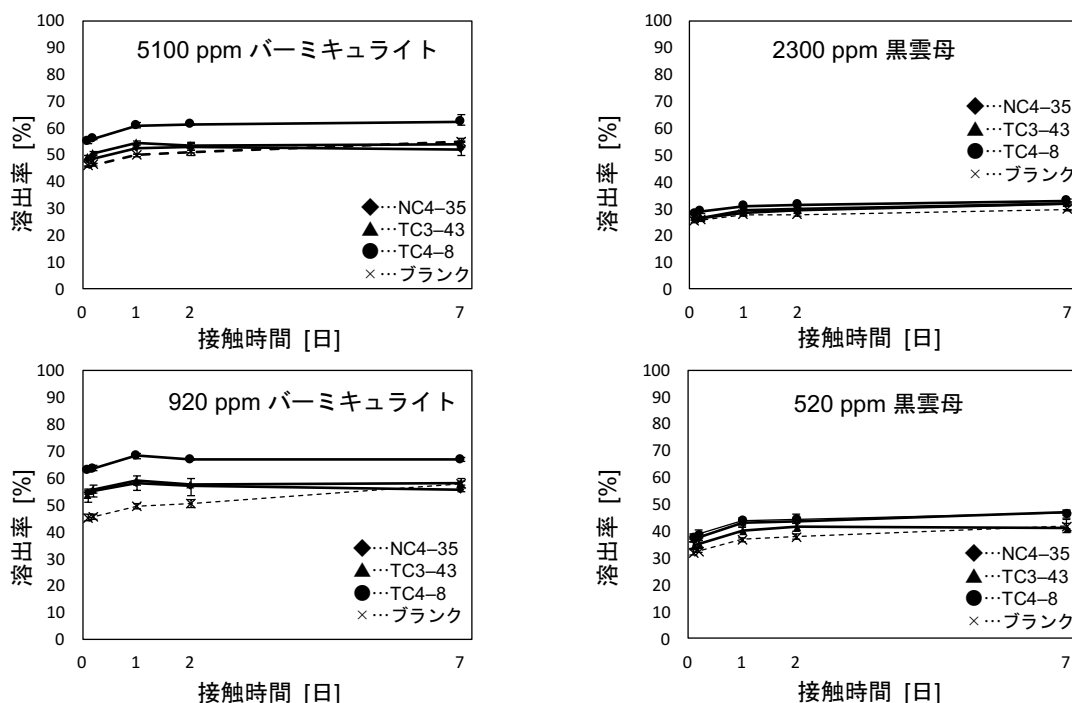


図 2-4 シデロホア溶液を用いた振とう試験の結果。エラーバーは標準偏差を表している。

8の溶出率は、ブランク試験の溶出率に比べて有意な増加が見られた。表2-4に振とう試験7日目における検定結果を示す。溶出率の増加はバーミキュライトでは約8ポイント、黒雲母では3~5ポイントの増加であった。この増加は、30、60分の短時間ですでに起こっており、1、2および7日後においても継続している。1時間以内の短時間でセシウムの溶出量が有意に増加することは報告されていない。シデロホアによるセシウム溶出率の増加から、シデロホアにより溶存態のセシウムが供給されることが考えられる。NC4-35およびTC3-43については、振とう試験を開始して2日目までは、ブランク試験と比較して高い溶出率であったが、7日目にはブランク試験と同程度の溶出率となった。これは、2日目までは水溶態として存在していたセシウムが粘土鉱物に再吸着したことが理由と考えられる。Hazotteら[1]の報告によると、100 µg-Cs/g-clay および 10 µg-Cs/g-clay のセシウムが添加されたイライトにおいては、50 µM に調整した *Pseudomonas fluorescens* (ATCC17400) の生産したシデロホア溶液によって、溶出率はそれぞれ 16 ポイントおよび 18 ポイント増加した。*Pseudomonas fluorescens* (ATCC17400) は鶏卵から単離された微生物である。一方で本研究において用いた微生物は植物根から単離されたものである。つまり、植物根に生息する微生物においても、生産されたシデロホアはセシウムの溶出量を増加させる効果があると言える。

2.4. まとめ

本章では、セシウムの溶出に効果があると報告されており、シデロホア生産能力を有する微生物である *Pseudomonas* 属微生物に着目し、まず植物根に内生し、シデロホア生産能力を有する *Pseudomonas* 属を選択した。次にそれらの微生物の作るシデロホアが、粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出に与える影響を実験的に検討した。その結果得られた主な知見は以下の通りである。

(1) 複数のホワイトクローバーの根から、シデロホアを生産する *Pseudomonas* 属微生物を単離することができた (約 2.4%)。また、それらの生産するシデロホア量には違いがあった。

(2) シデロホア生産物を含む培養液は、粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出量を増加させる効果があり、先行研究の報告と類似していた。ブランク試験と比較して、溶出率の増加は最大で、5100 µg-Cs/g-clay および 920 µg-Cs/g-clay バーミキュライトでは 2.5 ポイント (TC4-8) および 2.6 ポイント (TC3-43)、2300 µg-Cs/g-clay および 520 µg-Cs/g-clay 黒雲母では 1.9 ポイント (TC4-8) および 3.2 ポイント (TC3-43) であった。

(3) シデロホアによって、粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出量は、ブランク試験と比較して、1時間で増加した。また、5100 µg-Cs/g-clay および 920 µg-Cs/g-clay バーミキュライトでは最大で 62.2% および 66.9%、2300 µg-Cs/g-clay および 520 µg-Cs/g-clay 黒雲母では 32.6% および 47.0% のセシウムが溶出し、5100 µg-Cs/g-clay バーミキュライト以外では、

ブランク試験と比較して有意な増加が認められた。

参考文献

1. Hazotte, A.A., et al., *Microbial mobilization of cesium from illite: The role of organic acids and siderophores*. Chemical Geology, 2016. **428**: p. 8-14.
2. Yamaji, K., et al., *Root endophytic bacteria of a (137)Cs and Mn accumulator plant, Eleutherococcus sciadophylloides, increase (137)Cs and Mn desorption in the soil*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 112-119.
3. Veresoglou, D., et al., *Caesium and strontium uptake by two pasture plant species grown in organic and inorganic soils*. Agriculture, ecosystems & environment, 1995. **56**(1): p. 37-42.
4. Hazotte, A., et al., *Effect of Pseudomonas fluorescens and pyoverdine on the phytoextraction of cesium by red clover in soil pots and hydroponics*. Environ Sci Pollut Res Int, 2018. **25**(21): p. 20680-20690.
5. Péron, O., et al., *Effect of the bacterial pyoverdine siderophore on the phytoextraction of cesium from illite*. Environmental Chemistry Letters, 2018. **17**(1): p. 521-526.
6. 畑 邦彦, 菌類の採集・検出と分離: 植物関連菌 (寄生菌, 共生菌, 腐生菌): 内生菌. 日菌報, 1997. **38**: p. 110-114.
7. Schwyn, B. and J.B. Neilands, *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Analytical Biochemistry, 1987. **160**(1): p. 47-56.
8. Alexander, D. and D. Zuberer, *Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria*. Biology and Fertility of soils, 1991. **12**(1): p. 39-45.
9. Meyer, J.M., et al., *Use of siderophores to type pseudomonads: the three Pseudomonas aeruginosa pyoverdine systems*. Microbiology (Reading), 1997. **143** (Pt 1): p. 35-43.
10. Hersman, L., T. Lloyd, and G. Sposito, *Siderophore-promoted dissolution of hematite*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1995. **59**(16): p. 3327-3330.
11. 木村 建貴, et al., シデロホアによる粘土鉱物中セシウムの脱離現象に関する研究. 土木学会論文集 G (環境) , 2018. **74**(7): p. III_503-III_508.
12. Wendling, L.A., et al., *Cesium desorption from illite as affected by exudates from rhizosphere bacteria*. Environmental science & technology, 2005. **39**(12): p. 4505-4512.

第3章 粘土鉱物の違いがシデロホアによるセシウム溶出現象に与える影響

3.1. はじめに

土壤中の放射性セシウムの吸着には、層状構造を有した粘土鉱物が大きく関わっており、特にフレイドエッジサイトなどのセシウム選択の高い吸着サイトが強く関係している。セシウム選択の高い吸着サイトは、鉱物種によって異なっている。さらに、セシウム選択の高い吸着サイトは、鉱物の風化過程においても生成されることがある。そこで本章では、シデロホアによる粘土鉱物からのセシウム溶出現象に関して、複数種の粘土鉱物および風化作用を施した粘土鉱物をシデロホア溶液による振とう試験に供し、粘土鉱物の違いや風化作用がセシウム溶出現象に与える影響を明らかにすることを試みた。

3.2. 実験方法

本章では、まずいくつかの粘土鉱物に対して、人工風化処理を施し、鉱物の変化を観察した。次に、風化処理前の粘土鉱物と、風化作用を施した粘土鉱物を対象として、セシウムの吸着試験を行い、粘土鉱物の違いと風化作用がセシウム吸着に及ぼす影響を評価した。これらのセシウムを吸着させた粘土鉱物は、シデロホア溶液による振とう試験に供し、シデロホアによるセシウム溶出挙動の違いを検討した。

3.2.1. 粘土鉱物

使用した粘土鉱物は黒雲母 (#8. ED. 120-1、株式会社ニチカ)、バーミキュライト (#8. EG. 540-2、株式会社ニチカ)、イライト (#16-3-20-1、株式会社ニチカ)、カオリナイト (JCSS-1101c、日本粘土学会)、モンモリロナイト (JCSS-3102、日本粘土学会)、ディッカイト (JCSS-1301、日本粘土学会)、パイロフィライト (JCSS-2101、日本粘土学会) の 7 種類である。黒雲母、バーミキュライト、イライト、モンモリロナイト、パイロフィライトは 2:1 型鉱物であり、ディッカイトとカオリナイトは 1:1 型鉱物である。黒雲母、バーミキュライトはメノー乳鉢で湿式粉碎した。その後、74 μm の標準ふるいを通過したものを実験に供した。イライト、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトは、74 μm の標準ふるいを通過したものを実験に供した。

日本粘土学会より入手した参考試料 4 種類 (カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライト) は、比表面積が報告されている [1]。一方、黒雲母、バーミキュライト、イライトに関しては報告がないため、BET 法による比表面積の測定を行った。粘土鉱物試料 250 mg を測定セルに入れ、加熱真空排気方式 (100°C) で 30 分間前処理した (バキュプレップ 061、島津製作所)。その後、BET 法にて比表面積を測定した (トライスター II、島津製作所)。

粘土鉱物の構造分析として、X 線回折 (XRD) 分析を行った (Mini Flex、株式会社リガク)。

データ取得条件は、 $2\theta/\theta=5-70$ 、ステップは 0.02° とした。線源は $\text{Cu}\alpha$ 線を使用した。

3.2.2. 人工風化処理

鉱物の風化は、層間に存在するカチオンの交換の影響が大きい。層間カチオンの交換による鉱物の人工風化処理は、いくつかの先行研究が存在する。黒雲母やバーミキュライトの層間に存在するカリウムの交換には、テトラフェニルホウ酸ナトリウム (TPBNa) が有効であることが示され、カリウムの交換に伴う粘土鉱物の性質の変化が確認された[2]。同様に、イライト[2]やモンモリロナイト[3]に対しても、TPBNa の有効性が報告されている。モスコバイト、黒雲母、金雲母、バーミキュライト、イライトに対して 1M TPBNa による層間のカリウムの交換を行った実験においては、黒雲母、金雲母、バーミキュライトにおいては、90%以上のカリウムを交換でき、モスコバイトは8割以上、最も少ないイライトにおいても66%のカリウムが交換されることが報告された[2]。TPBNa で人工風化させた金雲母は、 γ -リン酸ジルコニウムなどのセシウム吸着剤よりも多くのセシウムを吸着し[4]、ストロンチウムに対しても吸着効果があることがわかっている[5]。TPBNa によるカリウム交換はトバモライトに対しても、他のカチオンと比較してセシウムに対して高い選択性を与え[6]、TPBNa によるカリウム交換処理を施した黒雲母においては、セシウムイオンの取り込み量が、理論的な陽イオン交換容量の50%にまで達すると報告されている[7]。TPBNa によるカリウム交換液にはいくつかのレシピがあり、オリジナルのレシピ[2]は 1M NaCl、0.2M TPBNa、0.01M EDTA もしくは 1M NaCl、0.3M TPBNa、0.01M EDTA である。TPBNa 濃度を 0.02M に変更したものを、黒雲母の人工風化処理に適用することもできる[8]。この条件であっても、黒雲母の風化は進み、セシウムの吸脱着に変化を与えることがわかっている[9]。

本研究では、黒雲母、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトにカリウム交換液を用いて試料中のカリウムを除去した。本研究では、Dreher ら[8]、Maes ら[9]が用いた EDTA を含むカリウム交換液を使用した (1M NaCl、0.02M テトラフェニルホウ酸ナトリウム、0.01M EDTA \cdot 2Na)。250 mg の粘土鉱物試料に 25 mL のカリウム除去液を加え、3日間振とうした。黒雲母の90%以上のカリウムは、3日間の処理で溶出する[2]。振とう後、10 mL のアセトンを加え、遠心分離により上澄み液を取り除く。その後、50%アセトンで洗浄し、遠心分離により上澄み液を取り除く。残渣に 25 mL のカリウム除去液を加え、さらに1日間振とうした。振とう後は、10 mL のアセトンを加え遠心分離し、その後50%アセトンで洗浄した。この操作は2回繰り返した。その後、超純水で3回洗浄し、風乾させた。乾燥後、XRD 測定を行った。

3.2.3. セシウム吸着試験

セシウムはバッチ形式により粘土鉱物に吸着させた。粘土鉱物 1 g に 1 M CsCl 溶液 100 mL を加え、1週間振とうした。遠心分離し上澄みを取り除いた後、超純水で3回洗浄した。

セシウム添加した粘土鉱物のうち 500 mg に、1 M 酢酸アンモニウム溶液を 50 mL 加え、24 時間振とうした。遠心分離し上澄みを取り除いた後、超純水で 3 回洗浄した。吸着したセシウム量は、セシウム吸着液の濃度と、振とう後の溶液中のセシウム濃度の差から求めた。

3.2.4. シデロホア溶液による振とう試験

1M 酢酸アンモニウム溶液で洗浄した粘土鉱物 20 mg を、それぞれ 50 mL 遠沈管に入れ、10 μ M シデロホア溶液を 20 mL 添加し、24 時間振とうした。また、ブランク試験として、超純水を 20 mL 添加し、同様に 24 時間振とうした。振とう後、遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した。ろ液は、硝酸で酸性にしたのち、ICP-MS でセシウム濃度を測定した。振とう試験における pH 条件は、pH に依存した鉱物の溶解が最小にするために、7 付近とした。

黒雲母は、振とう試験の効果を明確にするため、上記の振とう試験を繰り返した。遠心分離後に残った粘土鉱物に、新鮮なシデロホア溶液を 20 mL 加え、24 時間振とうした。振とう後、遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した。この操作を 4 回繰り返した。ろ液は、硝酸で酸性にしたのち、ICP-MS でセシウム濃度を測定した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 粘土鉱物

BET の式を用いた解析によって得られた比表面積は、黒雲母が 22.9 ± 0.26 m^2/g 、バーミキュライトが 28.0 ± 0.43 m^2/g 、イライトが 85.4 ± 0.29 m^2/g である。宮脇ら (2011) の報告によると、日本粘土学会より入手した参考試料 4 種類 (カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライト) の BET 比表面積は、カオリナイトが 14.82 m^2/g 、モンモリロナイトが 27.35 m^2/g 、ディッカイトが 3.69 m^2/g 、パイロフィライトが 4.63 m^2/g である。また、粘土鉱物の XRD パターンは、3.3.2. に示している。

3.3.2. 人工風化処理

人工風化処理の前後における XRD 測定の結果を図 3-1 に示す。カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトは、人工風化処理によって XRD パターンに変化は現れなかった。このことより、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトは、層間のカリウムの置換による風化作用は起こっていないことがわかる。これは、カオリナイト、ディッカイト、パイロフィライトは、四面体シートおよび八面体シートにおける同型置換がほとんど起こっておらず、層間内部のカチオンがほとんど存在していないことに起因すると考えられる。また、モンモリロナイトは、膨潤性により、カリウム

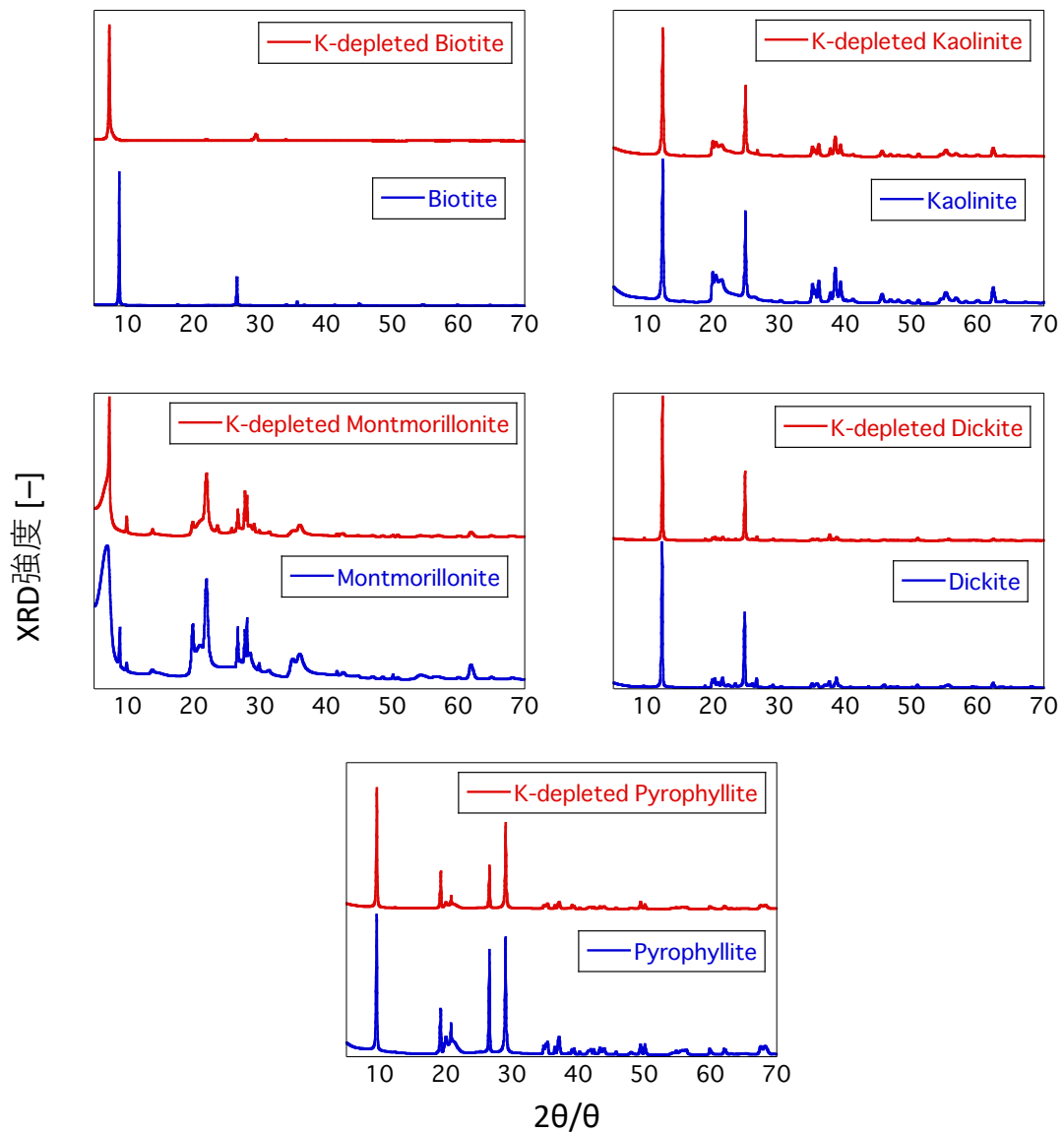


図 3-1 人工風化処理の処理前（下）および処理後（上）における XRD パターン。

の選択性がナトリウムよりも小さいことも原因のひとつと考えられる。一方で、黒雲母は人工風化処理によって XRD パターンが変化した。人工風化処理前においては、 $2\theta/\theta = 8.78$ において強いピークが確認できた。これは 10.1 \AA に対応している。 10.1 \AA の層間距離は、雲母鉱物に特徴的に見られるものである。人工風化処理を施すことで、 $2\theta/\theta = 7.27$ の位置にピークが移動した。このピークは 12.1 \AA に対応している。すなわち、人工風化処理により層間距離が増加した。層間のカリウム除去による人工風化処理によって層間距離が増加することは、同様の報告がなされている[9, 10]。この層間距離の増加は、黒雲母の層間カチオンがナトリウムに置き換わったため、カリウムとナトリウムの分子サイズの違いに起因

する。黒雲母においては、人工風化させた試料を作成することができたが、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトでは人工風化処理による構造変化が見られなかった。したがって、風化による影響を検討する際は、黒雲母を人工風化させた試料を用いることとする。

3.3.3. セシウム吸着試験

吸着したセシウム量と吸着率は、式 3-1、3-2 に示すように、セシウム吸着液の濃度と振とう後の溶液中のセシウム濃度の差から求めた。

$$C_{Ad} = \frac{(C_0 - C_{H2O}) \times V_{H2O}}{M} \quad \dots \text{ (式 3-1)}$$

C_{Ad} : 粘土鉱物に吸着したセシウム濃度 ($\mu\text{g/g}$)
 C_0 : 振とう前の液相中のセシウム濃度 ($\mu\text{g/L}$)
 C_{H2O} : 振とう後の液相中のセシウム濃度 ($\mu\text{g/L}$)
 V_{H2O} : 吸着液量 (L)
 M : 粘土鉱物量 (g)

$$R_{Ad} = \left(1 - \frac{C_{H2O}}{C_0}\right) \times 100 \quad \dots \text{ (式 3-2)}$$

R_{Ad} : セシウム吸着率 (%)

また、1M 酢酸アンモニウム溶液による洗浄後、粘土鉱物に残存したセシウム濃度および脱離率を以下の式 3-3、3-4 を用いて求めた。

$$C_{Cs} = \frac{(C_{AmAc} - C_{AmAc0}) \times V_{AmAc}}{M} \quad \dots \text{ (式 3-3)}$$

C_{Cs} : 粘土鉱物に残存したセシウム濃度 ($\mu\text{g/g}$)
 C_{AmAc} : 1M 酢酸アンモニウム洗浄後の液相中のセシウム濃度 ($\mu\text{g/L}$)
 C_{AmAc0} : 1M 酢酸アンモニウム洗浄液中のセシウム濃度 ($\mu\text{g/L}$)
 V_{AmAc} : 洗浄液量 (L)

$$R_{Cs} = \left(1 - \frac{C_{Cs}}{C_{Ad}}\right) \times 100 \quad \dots \text{ (式 3-4)}$$

R_{Cs} : セシウム脱離率 (%)

黒雲母、バーミキュライト、イライト、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトおよび風化黒雲母に吸着したセシウム量、吸着率および酢酸アンモニウムを用いた洗浄後、粘土鉱物に残存したセシウム濃度および脱離率を表 3-1 に示す。風化黒雲母のみ吸着量が大きくなったのは、異なる時期に吸着液を調整しており、吸着液の濃度が異なっていたことに起因する。セシウムの吸着率に着目すると、黒雲母、バーミキュライト、イライト、風化黒雲母では 90%以上で非常に高かった。一方、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトでは 59.4-83.5%であった。また、1M 酢酸

表 3-1 粘土鉱物に吸着したセシウム量と吸着率

	セシウム吸着試験		酢酸アンモニウム洗浄		強く吸着した Cs [%]
	Cs 濃度[$\mu\text{g/g}$]	吸着率[%]	Cs 濃度[$\mu\text{g/g}$]	脱離率[%]	
B	61.0 \pm 1.0	93.0 \pm 5.8	21.6 \pm 1.2	64.6 \pm 3.7	35.4 \pm 2.0
V	65.1 \pm 1.0	99.4 \pm 1.8	55.1 \pm 1.2	15.4 \pm 0.4	84.6 \pm 2.2
I	65.7 \pm 1.0	100.0 \pm 2.5	33.8 \pm 2.0	48.6 \pm 2.9	51.4 \pm 3.1
K	55.6 \pm 1.1	83.5 \pm 3.5	3.7 \pm 1.3	93.4 \pm 34.5	6.6 \pm 2.4
M	49.6 \pm 1.0	75.1 \pm 2.1	1.8 \pm 1.9	96.4 \pm 98.9	3.6 \pm 3.7
D	39.9 \pm 1.3	59.4 \pm 2.1	7.0 \pm 1.4	82.5 \pm 16.9	17.5 \pm 3.6
P	48.1 \pm 1.3	71.5 \pm 3.5	5.1 \pm 1.5	89.5 \pm 27.2	10.5 \pm 3.2
WB	132.5 \pm 1.3	100.0 \pm 1.8	133.3 \pm 1.3	0.2 \pm 0.0	99.8 \pm 1.4

B: 黒雲母、V: バーミキュライト、I: イライト、K: カオリナイト、M: モンモリロナイト、D: ディッカイト、P: パイロフィライトおよび WB: 風化黒雲母

アンモニウム溶液による洗浄操作では、カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトにおいては、吸着したセシウムのうち 80%以上が脱離した。比較的多くのセシウムが吸着した黒雲母、バーミキュライト、イルイト、風化黒雲母では、0.2-64.6%の吸着したセシウムが脱離した。1M 酢酸アンモニウム溶液による洗浄操作後に残存したセシウムは、鉱物に比較的強く固定されていると考えられる。

カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライトの吸着率は 59.4-83.5%と広範囲ではあるものの、80%以上の吸着したセシウムが脱離している。その結果、酢酸アンモニウム洗浄後の粘土鉱物には、添加したセシウムの 3.6-17.5%しか残っていない。

セシウムの吸着は基本的にはイオン交換によって行われる[11]。カオリナイトやディッカイトなどのカオリン鉱物やパイロフィライトは同型置換が起こっておらず、それに由来する負電荷を有していない。実際、カオリナイトとディッカイトは CEC が 10cmol_c/kg 以下と小さいことが報告されている[12]。それ故、イオン交換による吸着が起こりにくく、また、吸着したセシウムも易交換性であるため、酢酸アンモニウム洗浄後の粘土鉱物にはほとんどセシウムが残っていない。モンモリロナイトは、八面体シート中のアルミニウムの一部がマグネシウムに置換しており、永久負電荷を持っている。しかし、非常に膨潤する性質も合わせているため、セシウムを強く吸着する層間サイトなどが存在しないと考えられる。そのため、セシウムの吸着能力が低い結果になったと考えられ、バーミキュライトはケイ酸塩四面体シートの約 25%のケイ素がアルミニウムに置換しており、アルミナ八面体シートのアルミニウムはほとんどがマグネシウムや鉄に置換しており、同型置換の割合が高く、永久負

電荷を多く帯びている。そのため、イオン交換よりも強く吸着しているセシウム量は 84.6% となったと考えられる。黒雲母、イライト、風化黒雲母は多くのセシウムを強く固定している。イオン交換よりも強く吸着しているセシウム量は、イライト、黒雲母、風化黒雲母の順に大きくなっていき、それぞれ 35.4%、51.4%、99.8% である。黒雲母、風化黒雲母、イライトはいずれも 2:1 型の層状粘土鉱物であり、非膨潤性である。そのため、イオン交換よりも強く吸着するセシウム量が多いと考えられる。また、イライトは 2 八面体型鉱物であり、黒雲母と風化黒雲母は 3 八面体型鉱物である。2 八面体型鉱物よりも 3 八面体型鉱物のほうが構造的な制約が多く、一般的に膨潤しにくい。セシウムの層間内部への侵入は、膨潤や風化作用による層間の開裂が重要である。黒雲母と比較して、イライトや風化黒雲母の方が層間内部のセシウム吸着サイトへアクセスしやすく、イオン交換よりも強く吸着するセシウム量が多くなったと考えられる。

3.3.4. シデロホア溶液による振とう試験

シデロホア溶液による振とう試験におけるセシウム溶出率を図 3-2 に示す。イライト、風化黒雲母は、シデロホアによりセシウム溶出率が有意に増加し (p 値<0.05)、それぞれ 1.7 倍、12.3 倍に増加した。カオリナイト、パイロフィライト、ディッカイト、モンモリロナイトは、誤差が大きくなった。これは、酢酸アンモニウム洗浄によって脱離したセシウム量が、セシウムの吸着量に対して大きかったことに起因している。また、黒雲母 (p 値=0.24) と

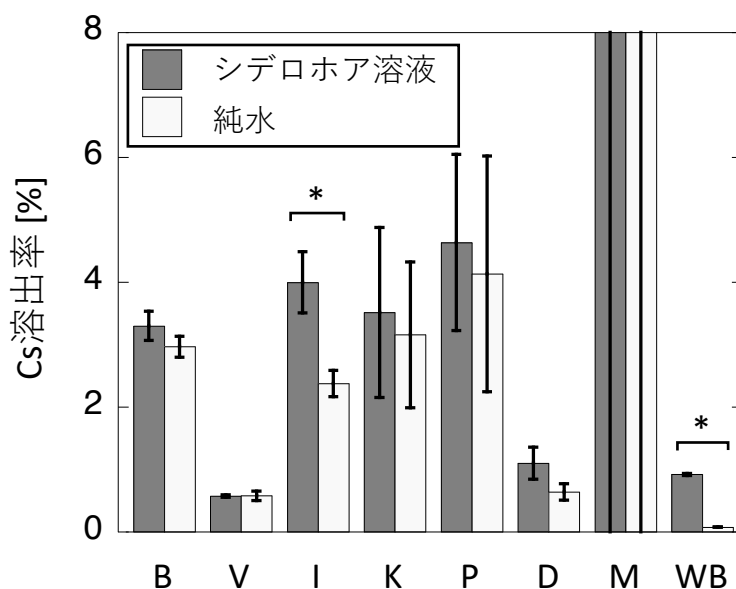


図 3-2 振とう試験におけるセシウム溶出率 (B: 黒雲母、V: バーミキュライト、I: イライト、K: カオリナイト、M: モンモリロナイト、D: ディッカイト、P: パイロフィライトおよび WB: 風化黒雲母)。*は p 値が 0.05 以下であったことを示している。

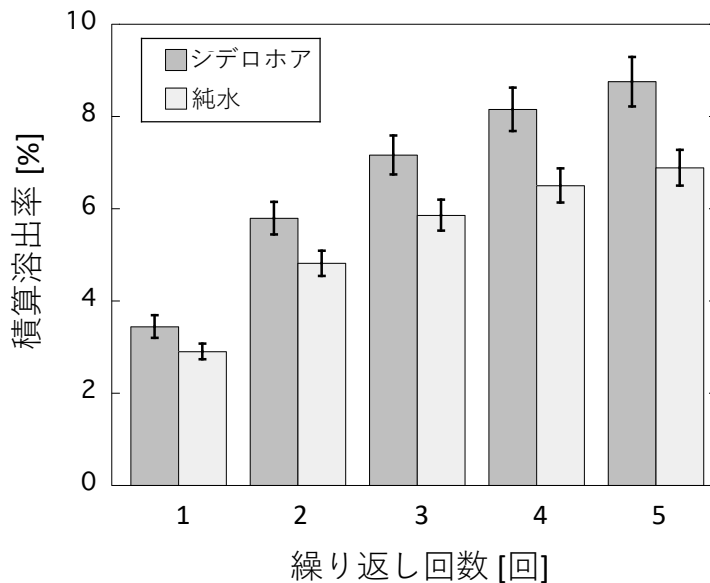


図 3-3 黒雲母の振とう試験の繰り返しにおけるセシウムの積算溶出率。

バーミキュライト (p 値=0.96) では有意な差は見られなかった。黒雲母は、土壤中におけるセシウム吸着挙動に大きな影響を与える鉱物であり、また p 値もバーミキュライトと比較して小さい。そこで、シデロホアによるセシウム溶出率への影響をより明確にするために、続けて 4 回の振とう試験を繰り返した。各振とう試験における液相中のセシウム濃度の積算結果を図 3-3 に示す。黒雲母では一回の振とう試験では有意な差が認められなかったが、5 回繰り返すことで、積算溶出率はシデロホア存在下で 8.8%、ブランク試験で 6.9% となり、有意に増加した (p 値<0.01)。

以上より、シデロホアが存在によってセシウムの溶出量が増加する鉱物は、黒雲母、イライト、風化黒雲母と明らかにした。いずれも多くセシウムを強く固定する性質を有している鉱物である。一方、シデロホアによるセシウム溶出量増加効果は認められなかった鉱物は、バーミキュライト、カオリナイト、パイロフィライト、ディッカイト、モンモリロナイトである。シデロホア存在によるセシウム溶出率の変化は、鉱物によって傾向が異なることを明らかにした。

3.4. まとめ

本章では、粘土鉱物の違いがシデロホアによるセシウム溶出現象に与える影響について、鉱物種と風化作用の観点から実験を行った。その結果得られた主な知見は以下の通りである。

(1) カオリナイト、ディッカイト、パイロフィライト、モンモリロナイトと比較して、バーミキュライト、黒雲母、イライト、風化黒雲母においてセシウムの吸着率が高くなった。これは粘土鉱物の膨潤性と同型置換量を反映した結果である。また、黒雲母、イライト、風化黒雲母における違いについても、八面体シート構造や風化（イオン交換）による層間構造の違いから説明することができた。

(2) シデロホア溶液による振とう試験を通じて、シデロホアによってセシウム溶出率が増加する鉱物は、黒雲母、イライト、風化黒雲母であることがわかった。一方、バーミキュライト、カオリナイト、パイロフィライト、ディッカイト、モンモリロナイトでは、シデロホアによるセシウム溶出率に違いは見られなかった。

参考文献

1. 宮脇 律郎, et al., *日本粘土学会参考試料の分析・評価*. 粘土科学, 2010. **48**(4): p. 158-198.
2. Scott, A. and S. Smith, *Susceptibility of interlayer potassium in micas to exchange with sodium*, in *Clays and Clay Minerals*. 1966, Elsevier. p. 69-81.
3. Reed, M. and A. Scott, *Chemical extraction of potassium from soils and micaceous minerals with solutions containing sodium tetraphenylboron: IV. Muscovite*. Soil Science Society of America Journal, 1966. **30**(2): p. 185-188.
4. Komarneni, S. and R. Roy, *A cesium-selective ion sieve made by topotactic leaching of phlogopite mica*. Science, 1988. **239**(4845): p. 1286-1288.
5. Stout, S.A., Y. Cho, and S. Komarneni, *Uptake of cesium and strontium cations by potassium-depleted phlogopite*. Applied Clay Science, 2006. **31**(3-4): p. 306-313.
6. Shrivastava, O. and S. Komarneni, *Cesium selectivity of (Al+ Na)-substituted tobermorite*. Cement and concrete research, 1994. **24**(3): p. 573-579.
7. Cho, Y. and S. Komarneni, *Cation exchange equilibria of cesium and strontium with K-depleted biotite and muscovite*. Applied Clay Science, 2009. **44**(1-2): p. 15-20.
8. Dreher, P. and E.-A. Niederbudde, *Potassium release from micas and characterization of the alteration products*. Clay Minerals, 1994. **29**(1): p. 77-85.
9. Maes, E., et al., *Fixation of radiocaesium traces in a weathering sequence mica→vermiculite→hydroxy interlayered vermiculite*. European Journal of Soil Science, 1999. **50**(1): p. 107-115.
10. Kitayama, R., J. Yanai, and A. Nakao, *Ability of micaceous minerals to adsorb and desorb caesium ions: Effects of mineral type and degree of weathering*. European Journal of Soil Science, 2020. **71**(4): p. 641-653.
11. Cornell, R., *Adsorption of cesium on minerals: a review*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1993. **171**(2): p. 483-500.
12. 島田 洋子, et al., *安定同位体セシウムを用いた土壌の放射性セシウム捕捉ポテンシャル (RIP) 測定法の開発*. 土木学会論文集 G (環境), 2017. **73**(7): p. III_185-III_194.

第4章 セシウム濃度がシデロホアによるセシウム溶出現象に与える影響

4.1. はじめに

粘土鉱物におけるセシウム吸着サイトには、鉱物の表面、エッジ部、フレイドエッジサイト、層間内部がある。これらの吸着サイトにはセシウムの濃度に依存した選択性があり、実験的な観察からは、 10^{-7}M 以下の濃度においてはフレイドエッジサイトに選択的に吸着される[1]。吸着サイトによってセシウムの選択性が異なることから、セシウム濃度が低い場合には、セシウムの溶出挙動も変化することが考えられる。そこで本章では、高濃度あるいは低濃度のセシウムを黒雲母に吸着させ、シデロホア溶液によるセシウム溶出試験に用いることで、セシウム濃度の違いが与える影響を明らかにする。

4.2. 実験方法

安定同位体セシウムの測定には ICP-MS を用いることで、高感度な測定を行うことができる（検出限界およそ $0.5\ \mu\text{g/L}$ ）。一方、放射性セシウムは、放射能を測定することで定量できる。放射性セシウム-137 が放出する放射線は β 線および γ 線であり、液体シンチレーションカウンター（検出限界 $1\ \text{Bq/L}$ 以下）やゲルマニウム半導体検出器（検出限界 $1\ \text{Bq/L}$ 以下）などにより、ICP-MS よりもさらに高感度な測定を実施できる。以上より放射性セシウムを用いることで、濃度が 10^{-7}M 以下のトレーサーレベルの領域での実験が可能となる。なお、放射性セシウム-137 の比放射能は、 $3.12 \times 10^{13}\ \text{g/Bq}$ である。

4.2.1. 安定同位体セシウムを吸着させた黒雲母の振とう試験

第3章の 3.2.3.と同様の方法で、バッチ方式にて黒雲母にセシウムを吸着させた。黒雲母 $1\ \text{g}$ に、 $1\ \text{M}$ のセシウム溶液を $100\ \text{mL}$ 添加し 1 週間振とうした。振とう後は遠心分離し（ $10,000\ \text{rpm}$, $15\ \text{min}$ ）、吸着液を取り除いた。その後、超純水で洗浄し、 45°C で乾燥させた。添加されたセシウム量は、セシウム吸着液の濃度と、振とう後の溶液中のセシウム濃度の差から求めた。さらに、余剰のセシウムを除去するため、 $1\ \text{M}$ 酢酸アンモニウム溶液を $100\ \text{mL}$ 加え、24 時間振とうした。振とう後は遠心分離し（ $10,000\ \text{rpm}$, $15\ \text{min}$ ）、吸着液を取り除いた。その後、超純水で洗浄し、 45°C で乾燥させた。

セシウムを吸着させた黒雲母 $20\ \text{mg}$ に $10\ \mu\text{M}$ シデロホア溶液 $20\ \text{mL}$ 、また、ブランク試験として精製水 $20\ \text{mL}$ を添加し、48 時間振とうした。振とう後、遠心分離し（ $10,000\ \text{rpm}$, $15\ \text{min}$ ）、上澄み液を $0.45\ \mu\text{m}$ シリンジフィルターでろ過した。ろ液中の Cs 濃度は ICP-MS で測定した。

4.2.2. 放射性セシウムを吸着させた黒雲母の振とう試験

低濃度のセシウムの添加には、放射性セシウム (^{137}Cs) を使用した。黒雲母 $1.25\ \text{g}$ に精製水 $20\ \text{mL}$ を添加し、さらに $0.27\ \mu\text{M}$ $^{137}\text{CsCl}$ 溶液 (in $1.16\ \text{M HCl}$) を $200\ \mu\text{L}$ 添加した。

0.27 μM $^{137}\text{CsCl}$ 溶液は、76.3 Bq/ μL に相当する。なお、放射能は 2020 年 4 月 1 日の値に補正した。その後、48 時間振とうし、遠心分離する (10,000rpm, 15min)。上澄み液は 0.45 μm シリンジフィルターでろ過した。その後、黒雲母を精製水で洗浄し、40°C で乾燥させた。添加されたセシウム量は、セシウム吸着液の濃度と、振とう後の溶液中のセシウム濃度の差から求めた。

Cs 添加した粘土鉱物 80 mg に 10 μM シデロホア溶液 4 mL、また、ブランク試験として精製水 4 mL を添加し、48 時間振とうした。振とう後、遠心分離し (10,000rpm, 15min)、上澄み液を 0.45 μm シリンジフィルターでろ過した。サンプリングした溶液のうち 1 mL は液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した。各サンプルにつき 30 分間の測定を 3 回繰り返した。

4.3. 結果と考察

4.3.1. セシウムの吸着量

黒雲母への安定同位体セシウムの吸着率は 97.3%であった。1M 酢酸アンモニウム溶液による洗浄で脱離した余剰のセシウムは、吸着量の 4.4%であり、セシウムの吸着量は 124 $\mu\text{g/g}$ となった。一方、放射性セシウムの吸着率は 99.7%であり、ほぼ全てのセシウムが黒雲母に吸着した。放射性セシウムの吸着量は、12500 Bq/g (= 3.9 ng/g) であり、これは福島原発事故後に報告されている粘土鉱物の濃度[2]のおよそ 5 倍の濃度である。

4.3.2. 黒雲母の振とう試験

安定同位体セシウムおよび放射性セシウムを添加した黒雲母の振とう試験の結果を図 4-1 に示す。安定同位体セシウムを添加した黒雲母の振とう試験において、セシウム溶出率は 3.1%であり、ブランク試験は 0.75%であった。一方、放射性セシウムを添加した黒雲母の振とう試験において、セシウム溶出率は 0.74%であり、ブランク試験は 0.35%であった。これらの結果から、シデロホアによるセシウム溶出現象は、トレーサーレベルのセシウム吸着量であっても起こることが明らかになった。トレーサーレベルでのセシウム濃度における、シデロホアによるセシウム溶出現象の研究はいくつか行われている。Yamaji ら[3]はシデロホアを生産する微生物の培養液によって、土壌からの放射性セシウムの溶出量が増加することを示しており、本研究における結果と一致する。Yamaji ら[3]のデータから得られる溶出率は 4%であり、ブランク試験では 2%である。先行研究においてはシデロホアの濃度が測定されておらず直接に比較することはできない。本研究の結果が Yamaji ら[3]によって得られた溶出率よりも低くなった原因として、培地成分の影響が考えられる。Yamaji ら

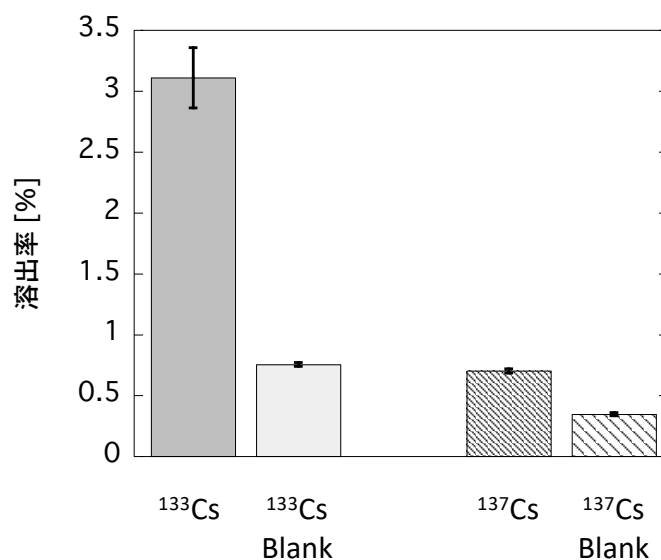


図 4-1 安定同位体セシウム (^{133}Cs) および放射性セシウム (^{137}Cs) を添加した黒雲母の振とう試験の結果

[3]の使用した培地には 1mM のカリウムが含まれている。カリウムはセシウムとイオン半径や水和半径が類似しており[4]、イオン交換することがある[5]。カリウムによってセシウムの交換が促進された結果、本研究で得られた溶出率よりも高くなったものと考えられる。

セシウムの濃度がトレーサーレベルであると、セシウムは選択的にフレイドエッジサイトに吸着されることが報告されている[6]。フレイドエッジサイトにおけるセシウムは、内圏型の錯体を形成する[7]。本研究における放射性セシウムを使用した実験では、セシウム濃度は $2.7 \times 10^{-9}\text{M}$ であり、先行研究[1]によると、非常に強固な固定サイトに選択的に吸着しており、安定同位体セシウムを使用した実験におけるでは、セシウムは選択性の異なる複数の吸着サイトに吸着している。安定同位体セシウムを吸着させた黒雲母においては、吸着したセシウムの一部は超純水により溶出しており(3.3.4.参照)、選択性が非常に低いセシウムが存在していることがわかる。このように、吸着したサイトが異なっているため、安定同位体セシウムを吸着させた黒雲母よりも、放射性セシウムを吸着させた黒雲母で溶出率が小さくなったと考えられる。

それぞれの条件で、シデロホアの存在による溶出率の増加は、安定同位体セシウムを吸着させた黒雲母ではおよそ 4.1 倍、放射性セシウムを吸着させた黒雲母ではおよそ 2 倍であった。放射性セシウムを使用した実験結果から、フレイドエッジサイトなどの非常に強固な固定サイトに吸着したセシウムの溶出量は、シデロホアによっておよそ 2 倍に増加することが予想できる。安定同位体セシウムを使用した実験においては、セシウム溶出量はおよそ 4.1 倍であり、放射性セシウムを使用した実験結果よりも大きい。これは、シデロホアは、

非常に選択性の高いセシウム吸着サイト（フレイドエッジサイトなど）以外の吸着サイトに対しても影響を及ぼしていることを示している。フレイドエッジサイトなどでよく生成されるセシウムの内圏型の錯体は、粘土鉱物の表面においても形成されることが指摘されている[8]。シデロホアが鉱物表面やエッジ部に作用したことで、これらの内圏型の錯体に由来するセシウムが溶出し、安定同位体セシウムを使用した実験における溶出率の増加が、放射性セシウムを使用した実験よりも顕著であったと考えられる。

4.4. まとめ

高濃度あるいは低濃度のセシウムを吸着させた黒雲母を作成し、シデロホア溶液によりそれらから溶出するセシウムを測定することで、セシウム濃度の違いが与える影響を把握することを試みた。その結果得られた主な知見は以下の通りである。

（１）安定同位体セシウムを添加した黒雲母の溶出率は 3.1%で、ブランク試験と比較しておよそ 4.1 倍大きくなった。放射性セシウムを添加した黒雲母の溶出率は 0.75%で、ブランク試験と比較しておよそ 2 倍大きくなった。

（２）シデロホアによるセシウムの溶出量は、フレイドエッジサイトへの選択性が非常に高くなるトレーサー濃度のセシウムが吸着した黒雲母においても、有意な増加が認められた。

参考文献

1. Bradbury, M.H. and B. Baeyens, *A generalised sorption model for the concentration dependent uptake of caesium by argillaceous rocks*. Journal of Contaminant Hydrology, 2000. **42**(2): p. 141-163.
2. Mukai, H., et al., *Speciation of radioactive soil particles in the Fukushima contaminated area by IP autoradiography and microanalyses*. Environ Sci Technol, 2014. **48**(22): p. 13053-9.
3. Yamaji, K., et al., *Root endophytic bacteria of a (¹³⁷Cs and Mn accumulator plant, *Eleutherococcus sciadophylloides*, increase (¹³⁷Cs and Mn desorption in the soil*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 112-119.
4. Wauters, J., et al., *Availability of radiocaesium in soils: a new methodology*. Science of the Total Environment, 1994. **157**: p. 239-248.
5. Murota, K., T. Saito, and S. Tanaka, *Desorption kinetics of cesium from Fukushima soils*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 134-140.
6. Sawhney, B., *Kinetics of cesium sorption by clay minerals*. Soil Science Society of America Journal, 1966. **30**(5): p. 565-569.
7. Qin, H., et al., *Investigation of cesium adsorption on soil and sediment samples from Fukushima Prefecture by sequential extraction and EXAFS technique*. GEOCHEMICAL JOURNAL, 2012. **46**(4): p. 297-302.
8. Fan, Q.H., et al., *An EXAFS study on the effects of natural organic matter and the expandability of clay minerals on cesium adsorption and mobility*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2014. **135**: p. 49-65.

第5章 シデロホアによるセシウム溶出現象のメカニズムの検討

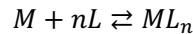
5.1. はじめに

シデロホアによるセシウム溶出現象については、いくつかの報告があるが[1]、溶出メカニズムの解明には至っていない。そこで本章では、この未解明のメカニズムの推定を試みた。まず、シデロホアの錯体形成に関する実験を行い、その特徴を調べた。粘土鉱物におけるセシウムの強固な吸着は、イオン交換やクーロン力による効果のみならず、構造的作用による影響も無視できない[2]。そこで、シデロホア溶液を用いた振とう試験において、粘土鉱物を構成する主要元素の溶出挙動や構造の特徴を調べ、粘土鉱物の構造に与える影響に関して調べた。最後に、これらをもとにシデロホアによるセシウム溶出現象のメカニズムの推定を試みた。

5.2. 実験方法

5.2.1. シデロホアによる錯形成

シデロホアによる第二鉄やセシウムとのキレート形成に関する検討を行った。シデロホアの錯形成の状態は吸光度を用いて計測した。シデロホアは鉄とキレートすることで吸光スペクトルに変化が現れる[3]。そこで、対応する吸光波長を用いた連続変化法 (Job's plot) [4]により錯形成を検討した。金属 M とリガンド L との錯体形成は、以下の平衡式で表される。また、この時の錯平衡定数を K_d とする。



$$K_d = \frac{[M][L]^n}{[ML_n]}$$

金属とリガンドの初期濃度をそれぞれ M_0 と L_0 とすると、

$$K_d = \frac{(M_0 - [ML_n])(L_0 - n[ML_n])^n}{[ML_n]}$$

リガンド濃度と金属濃度の和が一定とすると、

$$M_0 + L_0 = C_0 \text{ (constant)}$$

両辺を C_0 で割ると、

$$M_0/C_0 + L_0/C_0 = 1$$

ここで、金属およびリガンドのモル比を X 、 Y とすると、

$$X + Y = 1$$

また、

$$M_0 = C_0 X$$

表 5-1 連続変化法におけるサンプル添加量

シデロホアの モル比	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1mM シデロホア [μL]	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0.5mM Fe ³⁺ /Cs ⁺ [μL]	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0
H ₂ O [μL]	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900

$$M_0 = C_0(1 - Y)$$

$$L_0 = C_0Y$$

$$L_0 = C_0(1 - X)$$

これらを代入すると、

$$K_d[ML_n] = (C_0X - ML_n)(C_0(1 - X) - n[ML_n])^n$$

ここで、金属のモル比 X で微分すると、

$$K_d \left[\frac{d[ML_n]}{dX} \right] = \left(C_0 - \frac{d[ML_n]}{dX} \right) (C_0(1 - X) - n[ML_n])^n$$

$$+ (C_0X - ML_n)n(C_0(1 - X) - n[ML_n])^{n-1}(-C_0 - n \frac{d[ML_n]}{dX})$$

錯体の濃度が最大となる時、 $d[ML_n]/dX = 0$ となり、

$$0 = C_0^2(1 - (n + 1)X)(C_0(1 - X) - n[ML_n])^{n-1}$$

これを解くと、錯体の濃度が最大となる時の金属およびリガンドのモル比 X_m 、 Y_m は

$$X_m = \frac{1}{n + 1}$$

$$Y_m = 1 - X = \frac{n}{n + 1}$$

となる。これらより

$$\frac{Y_m}{X_m} = \frac{n/n + 1}{1/n + 1} = n$$

が得られる。すなわち、錯体濃度が最大となる条件における金属およびリガンドのモル比を用いることで、錯体形成比が求められる。

本研究においては、表 5-1 に示す条件で 1 mM のシデロホア溶液および 0.5 mM の Fe³⁺溶液または 0.5 mM のセシウム溶液を混合し、吸光スペクトルを測定した。これによりシデロホアの錯形成比を求めた。

次に 1 mM シデロホア溶液 50 μL に HCl および NaOH で pH = 2、4、6、8、10、12 (イ

オン強度 0.1) に調整した溶液 950 μL を加えて 50 μM とし、吸光スペクトルを測定した。また、0、20、50 μL のシデロホア溶液に、0.5 mM の Fe^{3+} 溶液 0、10、50、100 μL を加え、 $\text{pH}=2、4、6、8、10、12$ (イオン強度 0.1) の溶液で全量を 1000 μL にし吸光スペクトルを測定した。

5.2.2. 粘土鉱物構成元素の溶出挙動

シデロホアは鉄とはキレートを作すが、セシウムとはキレートをなさないことが示唆された (5.3.1. 参照)。この点から、シデロホアはセシウムに直接作用せず、別のメカニズムによってセシウムの溶出を促進させていることが考えられる。先行研究において、このメカニズムは、イオン交換によるものではなく [5]、鉱物の Al-O や Fe-O 結合に関係があることが示唆されている [1]。層状構造を有する粘土鉱物においては、アルミニウムや鉄などの金属元素は含まれているため、これらの元素の溶出量を把握することで、シデロホアによるセシウム溶出効果のメカニズムにアプローチすることができると考えた。そこで、様々な種類の粘土鉱物を用いて、シデロホアによる振とう試験における粘土鉱物の主要な構成元素 (鉄、アルミニウム、マグネシウム) の溶出量を測定した。

使用した粘土鉱物は第 4 章で使用した黒雲母 (#8. ED. 120-1、株式会社ニチカ)、バーミキュライト (8. EG. 540-2、株式会社ニチカ)、イライト (#16-3-20-1、株式会社ニチカ)、カオリナイト (JCSS-1101c、日本粘土学会)、モンモリロナイト (JCSS-3102、日本粘土学会)、ディッカイト (JCSS-1301、日本粘土学会)、パイロフィライト (JCSS-2101、日本粘土学会)、黒雲母に人工風化処理を施した風化黒雲母の 8 種類である。

日本粘土学会より入手した参考試料 4 種類 (カオリナイト、モンモリロナイト、ディッカイト、パイロフィライト) の構成元素は報告されている [6] が、黒雲母、バーミキュライト、イライトに関しては報告がない。そこで、酸分解処理により含有する元素の分析を行った。粘土鉱物 20 mg をテフロン製容器に入れ、70% HClO_4 を 1 mL と 38% HF を 2 mL 加えた。容器の蓋をし、160 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレートで 2 時間加熱し、室温で冷却した。蓋を取り 100 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレートで加熱し、酸溶液を蒸発乾固させた。その後、70% HClO_4 を 0.5 mL と 38% HF を 1 mL 加え、容器の蓋をして 160 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレートで 2 時間加熱し、室温で冷却した。蓋を取り 100 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレートで加熱し、酸溶液を蒸発乾固させた。この操作は 2 回繰り返した。10% 硝酸 1 mL と 20% H_2O_2 20 μL を加え、100 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレートで加熱し完全に溶解させた。溶液は 1% 硝酸で回収し、回収溶液中の鉄、アルミニウム、マグネシウムを ICP-OES で測定した。

振とう試験は第 3 章と同様の方法で行った。粘土鉱物試料 1 g に 1 mg/L セシウム溶液を 100 mL 加え、7 日間振とうした。振とう後、遠心分離により上澄み液を取り除いた。その後超純水で 5 回洗浄し、45 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥させた。次に、1 M 酢酸アンモニウム ($\text{pH}=7.0$) を 100 mL 加え、24 時間振とうした。振とう後、遠心分離により上澄み液を取り除いた。その後超純水で 3 回洗浄し、45 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥させた。1M 酢酸アンモニウムで洗浄した粘土鉱物を

20 mg をそれぞれ 50 mL 遠沈管に入れ、10 μ M シデロホア溶液を 20 mL 添加し、24 時間振とうした。また、ブランク試験として、超純水を 20 mL 添加し、同様に 24 時間振とうした。振とう後、遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した。ろ液は、硝酸で酸性にしたのち、ICP-OES で鉄、アルミニウム、マグネシウム、ケイ素を測定した。また、黒雲母に関しては、第 3 章と同様に振とう試験を繰り返した。遠心分離後に残った粘土鉱物に、新しいシデロホア溶液を 20 mL 加え、24 時間振とうした。振とう後、遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した。この操作を 4 回繰り返した。ろ液は、硝酸で酸性にしたのち、ICP-OES で鉄、アルミニウム、マグネシウム、ケイ素を測定した。黒雲母は、振とう試験後に 45°C で乾燥させ、XRD 測定および SEM 観察を行った。

また、粘土鉱物から脱離したセシウムが粘土鉱物に再吸着し、脱離量が過小評価になっているかどうかを検討するため、1 M 酢酸アンモニウムを含む 10 μ M シデロホア溶液を用いた振とう試験を行った。黒雲母 20 mg を遠沈管に取り、1 M 酢酸アンモニウムを含む 10 μ M シデロホア溶液を 20 mL 加え、24 時間振とうした。振とう後、遠心分離し、上澄み液を 0.45 μ m シリンジフィルターでろ過した。この操作を 4 回繰り返した。また、ブランクとして 1 M 酢酸アンモニウムで同様の振とう試験を繰り返した。ろ液は、硝酸で酸性にしたのち、ICP-MS でセシウムを、ICP-OES で鉄、アルミニウム、マグネシウム、ケイ素を測定した。

5.3. 結果と考察

5.3.1. シデロホアによる錯形成

シデロホア溶液と Fe^{3+} 溶液を用いた連続変化法における各条件の吸光スペクトルを図 5-1 に示す。先行研究[3, 7]と同様、得られたスペクトルにおいて、480 nm 付近に鉄との結合に由来する新たな吸収極大が出現した。そこで、480 nm における吸光度を用いて、ジョブプロットを行った結果を図 5-2 に示す。プロット結果から、シデロホアの実モル比がおよそ 0.5 において 480 nm における吸光度は最大となっていることが分かる。すなわち、シデロホアと鉄は 1 : 1 の比で錯体を形成していることがわかる。通常シデロホアは鉄と 1:1 で結合しており、先行研究と一致している[8]。一方、シデロホア溶液とセシウム溶液を用いた連続変化法における吸光スペクトルは、シデロホアの実モル比が減少するにしたがって、吸光度が減少している。この結果から、シデロホアはセシウムとキレート形成していないと考えられる。

5.3.2. 粘土鉱物構成元素の溶出挙動

使用した粘土鉱物の主要構成元素である鉄、アルミニウム、マグネシウムの含有量を表 5-2 に示す。シデロホア溶液を用いた振とう試験において、シデロホア溶液中に溶出した元素

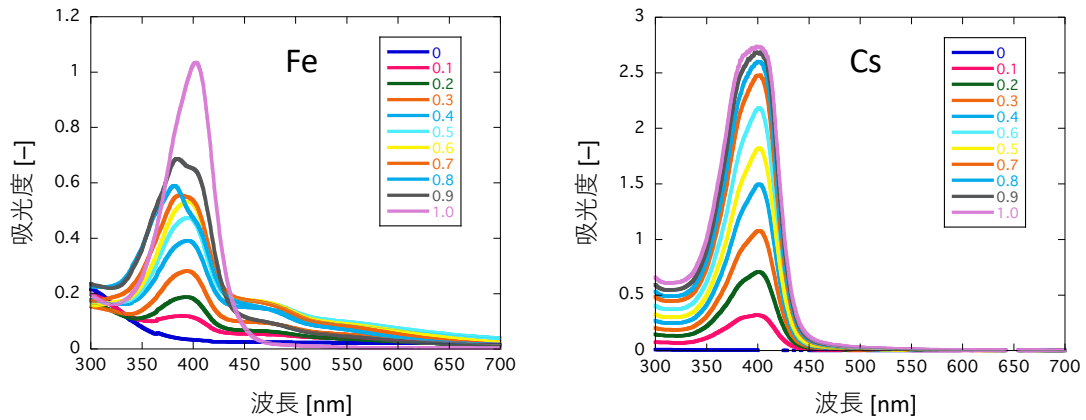


図 5-1 連続変化法における各条件での吸光スペクトル。凡例の数字はシデロホアのモル比を表している。

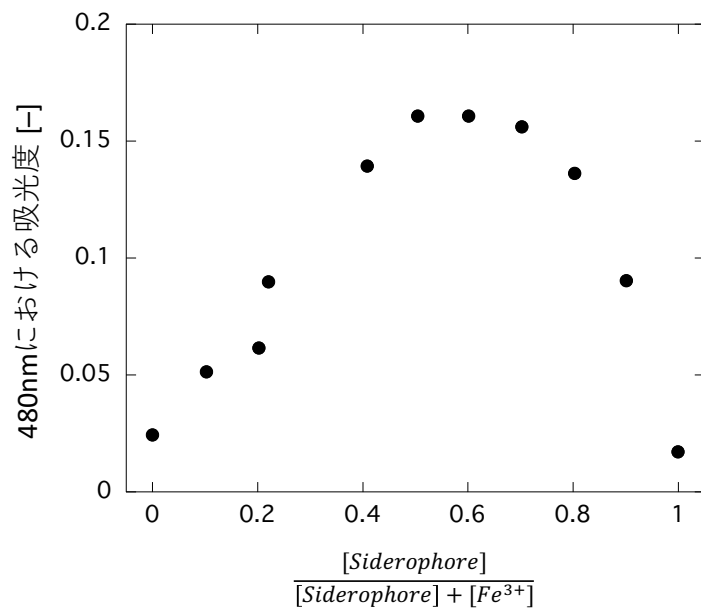


図 5-2 シデロホアと鉄のジョブプロット。

の濃度を図 5-3 に示す。第 3 章で検討したように、黒雲母、風化黒雲母、イライトでは、ブランク試験よりもシデロホア溶液を用いた場合にセシウムの濃度は高くなった。一方、モンモリロナイト、バーミキュライト、パイロフィライト、ディツカイト、カオリナイトでは同程度であった。鉄の濃度に着目すると、モンモリロナイトを除く全ての鉱物種でブランク試験よりもシデロホア溶液を用いた場合において濃度が高くなった。その中でも、黒雲母、イ

表 5-2 粘土鉱物中の鉄、アルミニウム、マグネシウム含有量 [mg/g]

鉱物	B	V	I	M	P	D	K
Al	84.0	55.0	3.9	31.5	61.7	102.1	96.8
Fe	150.8	34.9	55	5.6	0.7	0	0
Mg	20.5	128.8	10.6	15.7	0	0	0

鉱物の記号はそれぞれ、B：黒雲母、V：バーミキュライト、I：イライト、M：モンモリロナイト、P：パイロフィライト、D：ディッカイト、K：カオリナイトを表す。モンモリロナイト、パイロフィライト、ディッカイト、カオリナイトは、宮脇ら[6]の報告から計算した。

ライト、風化黒雲母では比較的濃度が高い。これらの鉱物は、他の鉱物よりも比較的多くの鉄が含まれており、シデロホアとのキレートを形成しやすいことが理由と考えられる。アルミニウム濃度の傾向は、モンモリロナイトを除く全ての鉱物種でブランク試験よりも、シデロホア溶液を用いた場合において濃度が高くなった。ケイ素濃度に関して、シデロホア溶液を用いた場合とブランク試験における濃度はイライト、カオリナイト、ディッカイトで有意な増加が認められたものの (p 値<0.05)、いずれも低濃度であった。上記以外の鉱物においては、ケイ素の濃度はブランク試験と比較して有意な差が認められず、同程度であった。

アルミニウム濃度とケイ素濃度は、粘土鉱物種による傾向が非常に似ており、黒雲母、モ

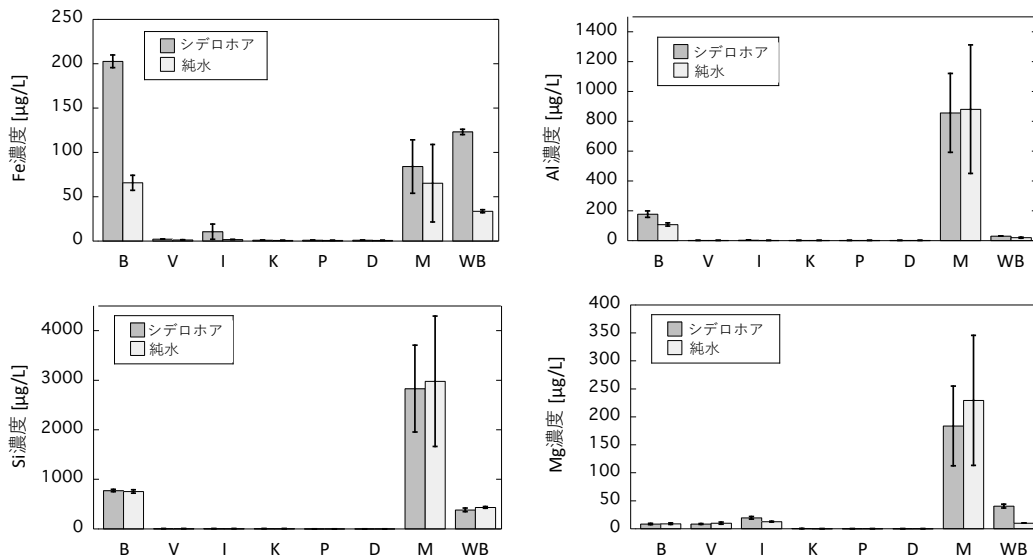


図 5-3 シデロホア溶液中の鉄、アルミニウム、マグネシウム、ケイ素の濃度 (B：黒雲母、V：バーミキュライト、I：イライト、M：モンモリロナイト、P：パイロフィライト、D：ディッカイト、K：カオリナイト、WB：風化黒雲母)。

ンモリロナイト、風化黒雲母において、比較的高い濃度が測定された。黒雲母と風化黒雲母に関しては、粘土鉱物構造中の四面体シートにおいて、ケイ素とアルミニウムは同型置換の関係がある。使用した黒雲母の全分解試験から得られた元素濃度を元に組成式を計算すると[9]、 $(\text{Si}_{3.4}\text{Al}_{0.6})(\text{Al}_{2.2}\text{Fe}^{2+}_{1.2}\text{Mg}_{0.4})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ で表される。つまり、四面体シート構造中のケイ素の約15%がアルミニウムに同型置換していると考えられる。溶出濃度に関して、ケイ素に対するアルミニウムのモル比は、黒雲母が0.24、風化黒雲母が0.08であり、それぞれのブランク試験においては、黒雲母が0.15、風化黒雲母が0.05である。四面体シート構造中のケイ素に対するアルミニウムのモル比0.18と比較すると、黒雲母ではブランク試験では同程度であり、シデロホアの存在下では増加している。これは、シデロホアの存在により、四面体シート構造の崩壊に加えて、さらにアルミニウムの溶出が起きていることが考えられる。黒雲母は、八面体シート中にもアルミニウムが存在しており、このアルミニウムが溶出したことが予想できる。また、鉄の濃度が高いことから、黒雲母の八面体シートに存在する鉄が溶出したと予想される。以上より、黒雲母は、シデロホアによって粘土鉱物構成元素を溶解させることができ、アルミナ八面体シート中の金属元素の溶出も可能にしていると考えられる。風化黒雲母においては、ケイ素に対するアルミニウムのモル比はシデロホア存在下で0.08であり、ブランク試験では、アルミニウムのモル比は0.05である。シデロホアの存在によりアルミニウムのモル比が大きくなっており、これは黒雲母同様、シデロホアの存在によりアルミナ八面体シート中の金属元素が溶出していると考えられる。一方、風化処理前の黒雲母と比較すると大きく減少している。これは、アルミニウムの溶出量が風化黒雲母では減少していることに起因していると考えられる。シデロホア-鉄錯体の厚さは 3.6\AA であると報告されている[10]。また、黒雲母の各シート構造の厚さは 2.2\AA であるとされている[11]。風化黒雲母は、層間イオンがカリウムからナトリウムに置換されたことに伴い、層間距離が 12.1\AA に増加した。シート構造自身の持つ厚さを考慮すると、層間の厚さは 5.5\AA となる。これは、シデロホアが層間に入る空間が存在していることを示唆している。シデロホアは粘土鉱物の層間内部に侵入することができ、層間のイオンがナトリウムであればより容易に侵入することができることが知られている[12]。つまり、風化黒雲母においても、シデロホアの層間への侵入が起きている可能性がある。このことは、層間に侵入できない場合（風化処理前の黒雲母）と比較して、容易に鉄にアクセスでき、そのためにアルミニウムの溶出量が減ったと推測できる。

黒雲母を用いて行った5回の振とう試験の繰り返し(3.3.4. 参照)における、各試行回数での溶液中の濃度から算出した積算の溶出率を図5-4に示す。振とう試験の回数が増加するにつれて、鉄、アルミニウム、マグネシウムの溶出率が増加しており、それぞれ5回目において、0.63%、0.74%、0.90%であった。一方、ブランク試験では、鉄とアルミニウムは、振とう回数による溶出率の変化は見られない。マグネシウムではブランク試験においても

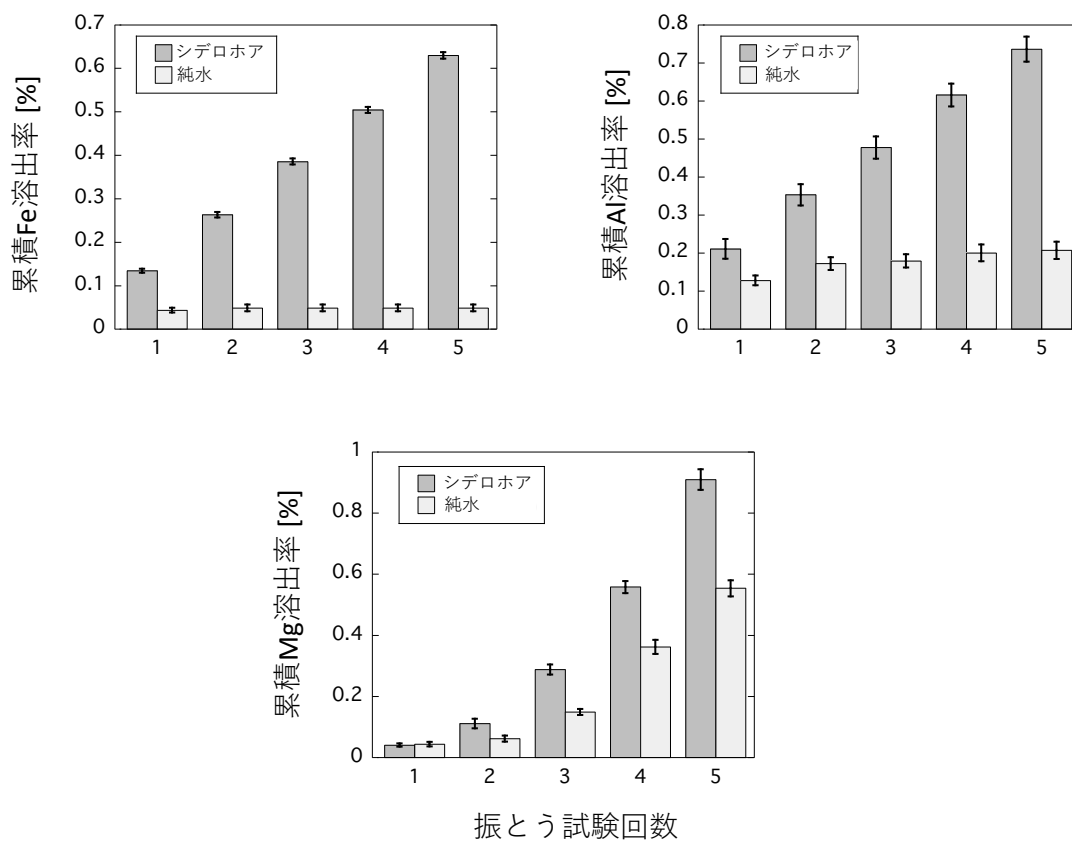


図 5-4 黒雲母の振とう試験の繰り返しによって溶出した元素の累積濃度

溶出率が増加したものの、溶出率はシデロホアの存在下よりも低くなった。なお、液相中のケイ素の濃度は、シデロホアの存在の有無による違いは認められなかった。シデロホアは鉄とのキレート能力は非常に高く、アルミニウムとも比較的強くキレートを形成することが知られている[13]。鉄とアルミニウムは、シデロホアとキレートを形成することにより、粘土鉱物から液相中へと移行したと考えられる。液相中の鉄とアルミニウムの溶出率、モル比は同程度であった。表 5-2 に示した黒雲母の組成においても、鉄とアルミニウムのモル比はほぼ同じであり、液相中のモル比と類似している。このことより、シデロホアは黒雲母から一様に鉄とアルミニウムを溶解させたと考えられる。すなわち、シデロホアによる鉄とアルミニウムの液相中への移行は、黒雲母の層構造全体が一様に溶解したために起こったと言える。

振とう試験の前後における黒雲母の XRD パターンの変化は見られなかった。これは、5 回の振とう試験を通じて、黒雲母の層構造および層間距離は変化しなかったことを示している。SEM 観察の結果を図 5-5 に示す。シデロホアを用いた振とう試験後の黒雲母試料は、大きな変化が見られないものが多かったものの、一部の黒雲母試料において、表面が平滑ではなくなった試料が観察された。この試料の表面の鉄、アルミニウム、ケイ素の分布を EDX

分析したところ、鉄は全体に分布していた。一方で、アルミニウムとケイ素は、シート構造の縁部分において不存在を示していた。アルミニウム、ケイ素は粘土鉱物の四面体シートを構成する元素であり、鉄は八面体シートを構成する元素である。四面体シートを構成する元素が表面において観察されず、八面体シートを構成する元素が観察されたことは、黒雲母表面の縁において、層構造が部分的に崩壊している可能性を示唆している。

黒雲母には、シデロホアによる鉱物の一様な溶解が起こった。鉱物は、このような変化により変質していく。変質などを伴う風化過程により、粘土鉱物のセシウム吸着能力は変化

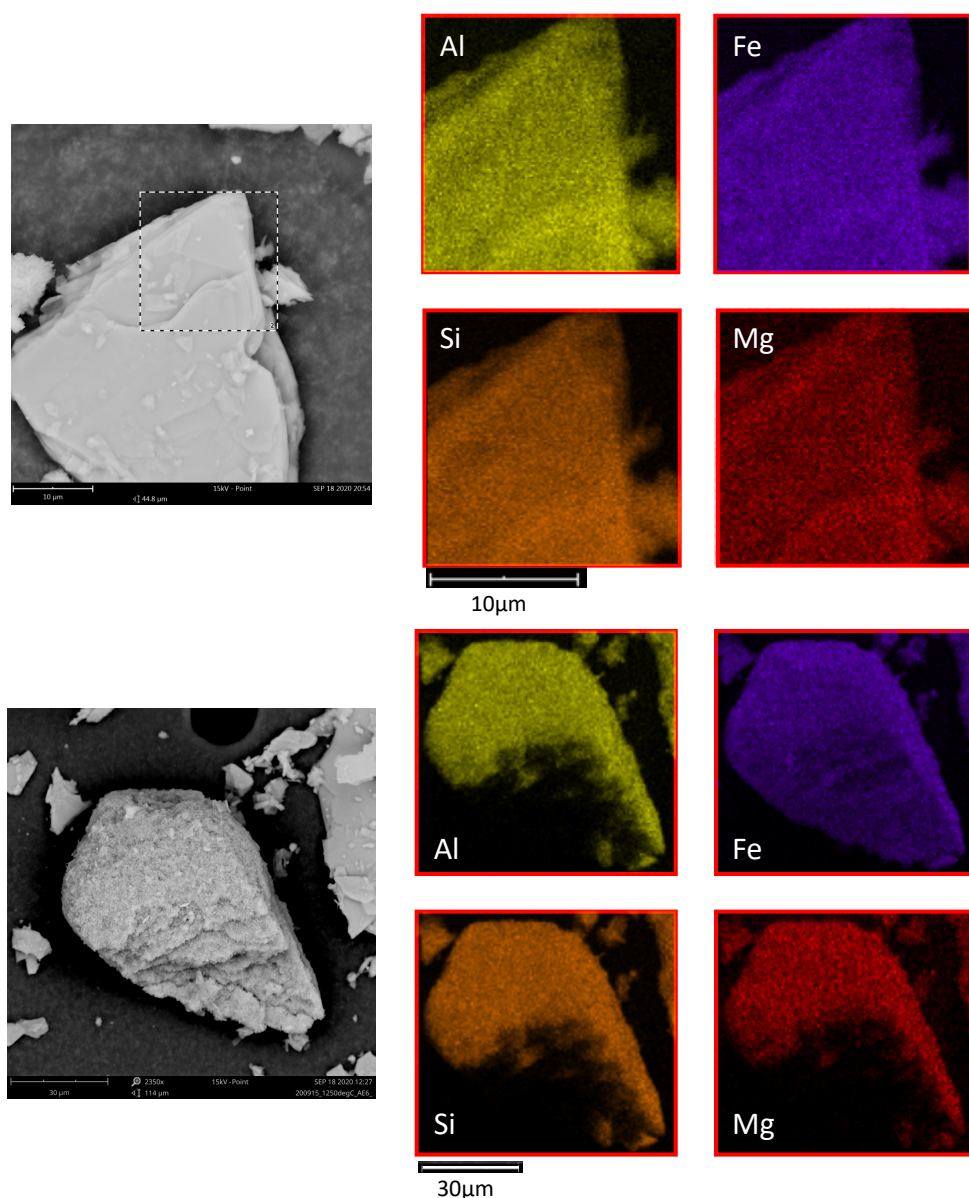
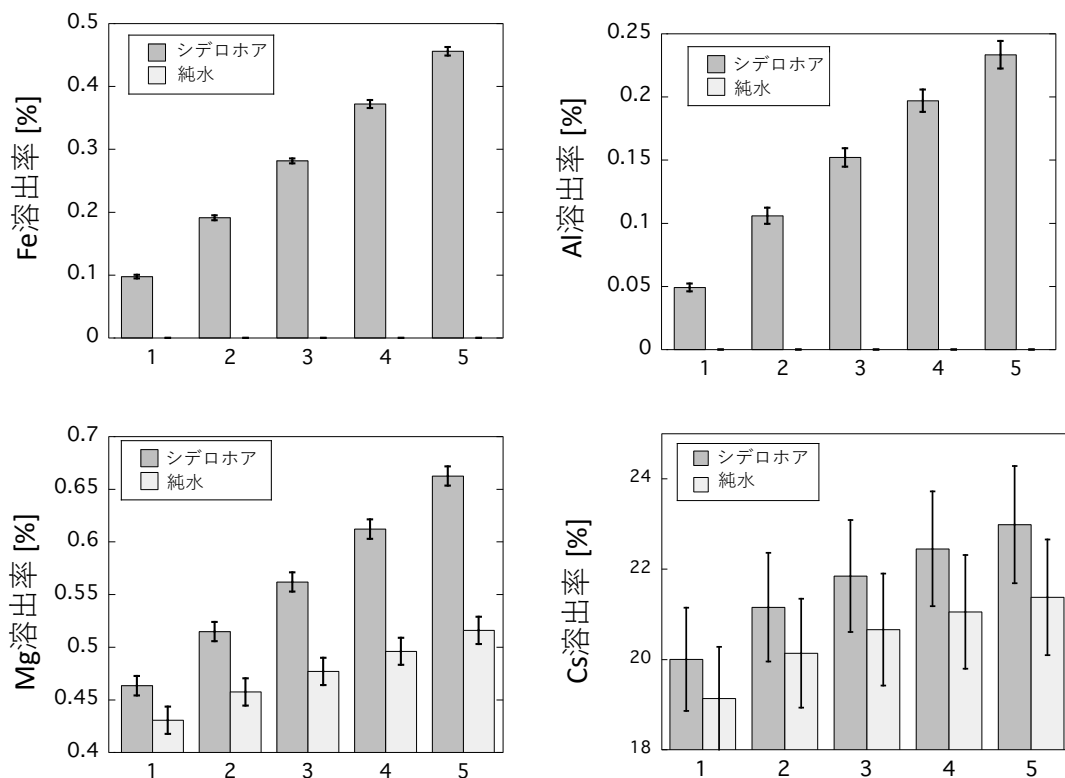


図 5-5 振とう試験後の黒雲母試料の SEM-EDX 観察の結果。平滑な表面構造を有したものの（上）や表面が平滑でなくなったもの（下）が観察された。



振とう試験回数

図 5-6 過剰のアンモニウムイオン存在かでのシデロホア振とう試験による、鉄、アルミニウム、マグネシウム、セシウムの累積溶出率。

する[14]。そのため、一度脱離したセシウムであっても、鉱物の溶解によって生じた新たな吸着サイトに再吸着している可能性がある。そこで、セシウムの競合イオンであるアンモニウムイオンが過剰に存在する条件において、シデロホアによるセシウム溶出量を評価した。1M 酢酸アンモニウムを含むシデロホア溶液による黒雲母の振とう試験を繰り返した際の鉄、アルミニウム、マグネシウム、セシウムの溶出率を図 5-6 に示す。液相中のセシウム溶出率は、1 回目の振とう試験においてシデロホア存在下において平均が 20.0%であり、ブランク試験との有意差は認められなかった (p 値 <0.26)。2 回目以降は溶出率の増加量は、1 回目と比較して大きく減少した。これは、イオン交換態として存在しているセシウムが 1 回目の振とう試験において溶出したことが理由と考えられる。3 回目以降はシデロホアの存在により、セシウム溶出量の有意な増加が認められ、5 回目の振とう試験後の積算の溶出率は、シデロホアの存在下で 23.0%、ブランク試験で 21.4%となった (p 値 <0.01)。鉄、アルミニウム、マグネシウムの溶出率は、アンモニウムイオンが存在しない場合と同様の傾向を示し、シデロホア溶液による振とう試験回数の増加に伴い、鉄、アルミニウム、マグネシウム

の溶出率は増加した。

アンモニウムイオンが存在しない場合は、第3章にて実験を行った。5回の振とう試験の積算のセシウム溶出率に関して、シデロホアの存在による増加量はアンモニウムイオン存在下で1.6% (p値<0.01)、アンモニウムが存在しない場合で1.9% (p値<0.01)であった。このことより、過剰のアンモニウムイオンの存在によって、セシウム溶出率は同程度に増加した。アンモニウムイオンは、カリウムイオンよりもセシウムにとっての競合イオンとしての性質がおよそ5倍高いことが示唆されている[15]。粘土鉱物において最もセシウムへの選択性が高いフレイドエッジサイトに置いては、セシウムの選択性はカリウムのおよそ1000倍以上とされている[16]。本実験条件においては、アンモニウムイオンの濃度は、セシウムイオンよりも数十万倍以上高いため、新たに出現したフレイドエッジサイトなどの吸着サイトへの再吸着の影響は小さいものと考えられる。

5.3.3. メカニズムの考察

透過電子顕微鏡を用いた観察により、セシウムは粘土鉱物の層間に一様に分布していたことが報告されている[17, 18]。また、福島県の土壌試料から分離された風化雲母についてもセシウムの一様な分布が推測されている[19]。セシウムは粘土鉱物の層間距離が1.0 nmから増加するに従い親和性が高くなることが示されており[2]、これはフレイドエッジサイトにおいてセシウムが高い親和性を有することに一致する。しかし、風化雲母に吸着したセシウムの溶出量は、経時変化により減少することも報告されている[20]。さらに、層間のカリウムはセシウムと交換することも報告されている[21]。これらを踏まえると、実験に使用した黒雲母においても層間にセシウムが分布している構造になっていることが予想できる。カリウムがセシウムと交換することでできた層間は、カリウムで満たされていた場合と比較してわずかに増加し、層間距離が1.07 nm となったと報告されている[17, 18]。本研究で使用した黒雲母試料においては、セシウム吸着後のXRD測定によって得られた層間距離は1.01 nmであった。これは経時変化による層間内部へのセシウムの進行が完了していないためと考えられる。このようなセシウムの内部への進行は、12ヶ月間の接触でおよそ90%のセシウムが層間内部へと進行すると見積もられている[18]。

シデロホアの存在によって液相中の鉄、アルミニウム、マグネシウムの濃度が有意に増加した点から、黒雲母を構成している鉄、アルミニウム、マグネシウムがシデロホア的作用により液相中に移動したと推測される。この結果は、先行研究[5, 22, 23]と一致している。シデロホアによる鉱物からの鉄の溶出に関して、シデロホアはモンモリロナイト層間内部に進入し、キレートを形成している可能性が指摘されている[12]。しかし、シデロホア溶液で振とう試験を繰り返した黒雲母のXRDパターンに変化は見られなかった。これは、実験に用いた黒雲母はモンモリロナイトのような膨張は示さないためと考えられる。つまり、本研究において、シデロホアは黒雲母表面やエッジ部などの部分に作用していると考えられる。SEM画像を見ると、シデロホアによる振とう試験を行った試料では、鉱物の表面が平滑で

はなくなったものが観察された。これらは、振とう試験前の粘土鉱物には見られなかった。黒雲母の EDS 分析の結果から、黒雲母表面の縁において、層構造が部分的に崩壊していることが考えられる。粘土鉱物の格子構造であるシート構造が溶解の可能性は指摘されており[24]、本研究でも層構造が溶解したと予想できる。しかし、この変化を直接的に観察することは難しい[25]。一方、セシウムに対して大過剰のアンモニウムイオンを添加した実験において、セシウムの溶出率の増加は、アンモニウムイオンの存在にかかわらず同程度であった。アンモニウムイオンの添加によりセシウムの溶出率の増加が同程度であったことは、アンモニウムイオンによるイオン交換では脱離しないセシウムが、シデロホアによって脱離していることを示している。

以上より、シデロホアの存在によるセシウム溶出現象のメカニズムは、次のように説明できる可能性がある。(1)まず黒雲母のエッジ部分に存在する鉄やアルミニウムなどの元素がシデロホアとキレート形成し、脱離する。(2)これらの元素が欠陥したこと付随して、シデロホアとはキレートをなさない元素も溶出してゆく。(3)エッジ部に吸着しているセシウムが脱離してゆく。

5.4. まとめ

本章では、シデロホアによるセシウム溶出現象について、振とう試験を中心とした実験の結果をもとに、溶出メカニズムの推定を行った。その結果得られた知見は以下の通りである。

(1) 実験に用いたシデロホアは、鉄と 1:1 で錯体を形成していた。

(2) シデロホアは、粘土鉱物のアルミナ八面体シート中の鉄とキレートを作る可能性が指摘された。

(3) シデロホアの存在による粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出量が増加する現象について、以下のメカニズムを推定した。(1)まず黒雲母のエッジ部分に存在する鉄やアルミニウムなどの元素がシデロホアとキレート形成し、脱離する。(2)これらの元素が欠陥したこと付随して、シデロホアとはキレートをなさない元素も溶出してゆく。(3)その結果、エッジ部に吸着しているセシウムが脱離してゆく。

参考文献

1. Chiang, P.N., et al., *Effects of low molecular weight organic acids on (137)Cs release from contaminated soils*. Appl Radiat Isot, 2011. **69**(6): p. 844-51.
2. Okumura, M., H. Nakamura, and M. Machida, *Mechanism of Strong Affinity of Clay Minerals to Radioactive Cesium: First-Principles Calculation Study for Adsorption of Cesium at Frayed Edge Sites in Muscovite*. Journal of the Physical Society of Japan, 2013. **82**(3).
3. Albrecht-Gary, A.-M., et al., *Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of Pseudomonas aeruginosa*. Inorganic Chemistry, 1994. **33**(26): p. 6391-6402.
4. Huang, C.Y., [27] *Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: The job plot*, in *Methods in enzymology*. 1982, Elsevier. p. 509-525.
5. Hazotte, A.A., et al., *Microbial mobilization of cesium from illite: The role of organic acids and siderophores*. Chemical Geology, 2016. **428**: p. 8-14.
6. 宮脇 律郎, et al., *日本粘土学会参考試料の分析・評価*. 粘土科学, 2010. **48**(4): p. 158-198.
7. Carrillo-Castañeda, G., J.J. Muñoz, and J.R. Peralta-Videa, *A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent Pseudomonas in the presence of copper and iron*. Microchemical Journal, 2005. **81**(1): p. 35-40.
8. Boukhalifa, H. and A.L. Crumbliss, *Chemical aspects of siderophore mediated iron transport*. Biometals, 2002. **15**(4): p. 325-339.
9. Foster, M.D., *Interpretation of the composition of trioctahedral micas*. US Geol. Surv. Prof. Pap., B, 1960. **354**: p. 1-49.
10. Van der Helm, D., *The Crystal structure of ferrioxamine E*. Journal of the American Chemical Society, 1976. **98**(1): p. 82-86.
11. 上原誠一郎, *粘土の構造と化学組成*. 粘土科学, 2000. **40**(2): p. 100-111.
12. Haack, E.A., C.T. Johnston, and P.A. Maurice, *Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe³⁺*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2008. **72**(14): p. 3381-3397.
13. Anderegg, G.v., F. l'Eplattenier, and G. Schwarzenbach, *Hydroxamatkomplexe II. Die Anwendung der pH - Methode*. Helvetica Chimica Acta, 1963. **46**(4): p. 1400-1408.
14. Kitayama, R., J. Yanai, and A. Nakao, *Ability of micaceous minerals to adsorb and desorb caesium ions: Effects of mineral type and degree of weathering*. European Journal of Soil Science, 2020. **71**(4): p. 641-653.
15. Wauters, J., et al., *Availability of radiocaesium in soils: a new methodology*. Science of the Total Environment, 1994. **157**: p. 239-248.

16. Brouwer, E., et al., *Cesium and rubidium ion equilibriums in illite clay*. The Journal of Physical Chemistry, 1983. **87**(7): p. 1213-1219.
17. Okumura, T., et al., *Direct observation of cesium at the interlayer region in phlogopite mica*. Microscopy, 2013. **63**(1): p. 65-72.
18. Fuller, A.J., et al., *Caesium incorporation and retention in illite interlayers*. Applied Clay Science, 2015. **108**: p. 128-134.
19. Mukai, H., et al., *Speciation of radioactive soil particles in the Fukushima contaminated area by IP autoradiography and microanalyses*. Environ Sci Technol, 2014. **48**(22): p. 13053-9.
20. Mukai, H., et al., *Cesium adsorption/desorption behavior of clay minerals considering actual contamination conditions in Fukushima*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21543.
21. Ruiz Pestana, L., et al., *Direct exchange mechanism for interlayer ions in non-swelling clays*. Environmental science & technology, 2017. **51**(1): p. 393-400.
22. Wendling, L.A., et al., *Cesium desorption from illite as affected by exudates from rhizosphere bacteria*. Environmental science & technology, 2005. **39**(12): p. 4505-4512.
23. Yamaji, K., et al., *Root endophytic bacteria of a (137)Cs and Mn accumulator plant, Eleutherococcus sciadophylloides, increase (137)Cs and Mn desorption in the soil*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 112-119.
24. Feigenbaum, S. and I. Shainberg, *Dissolution of Illite—A Possible Mechanism of Potassium Release*. Soil Science Society of America Journal, 1975. **39**(5): p. 985-990.
25. Okumura, M., et al., *Radiocesium interaction with clay minerals: Theory and simulation advances Post-Fukushima*. J Environ Radioact, 2018. **189**: p. 135-145.

第6章 有用なシデロホア生産微生物種の検討

6.1. はじめに

第5章までにおいて、微生物由来のシデロホアが粘土鉱物のセシウムの溶出に効果があることを述べた。環境中における微生物と植物との共生関係に関して検討を行うことは、微生物由来のシデロホアによるセシウム溶出現象が起こり得るかどうかを判断する上で非常に重要である。そこで本章では、土壌中のシデロホア生産微生物と、土壌で栽培した植物の根に共生した微生物の比較を通じて、土壌中におけるシデロホア生産微生物と植物との共生関係に関する検討を行う。

6.2. 実験方法

6.2.1. 土壌中のシデロホア生産微生物の単離

実験に供する土壌試料は、日本原子力研究開発機構（以後、JAEA）構内および福島県川俣町において、ホワイトクローバーが群生している場所で、ホワイトクローバーごと採取した。その後、根域土壌を分離した[1, 2]。土壌が付着した状態の根を軽くゆすり、土壌の一部を分離した。その後、根を水道水におよそ20分間浸してから、数十回かくはんした。次に、超純水に移し替えて数十回かくはんし、根と密着した土壌を分離させた。この攪拌液は、1% Tryptic Soy Broth 寒天（TSA）培地または1% Nutrient Broth 寒天（NBA）培地を用いた平板希釈法により25°Cで培養した。コロニーの分離がよくできている培地からそれぞれ456サンプルずつ微生物を単離培養した。次に根域土壌より単離培養した微生物のコロニーを、コルクローラーで打ち抜き、CAS 寒天培地[3]上に設置し、25°Cで培養し、シデロホア生産性の巣クロニングを行った。

6.2.2. ホワイトクローバーに共生するシデロホア生産微生物の単離

JAEA 構内および福島県川俣町において採取した土壌を用いて、栽培試験を行った。実験にはホワイトクローバーを用いた。ホワイトクローバーの種子を、水道水を入れたビーカーに入れ、静置した。ビーカーの底に沈んだ種子を以降の実験に用いた。ホワイトクローバーの種子は、70%エタノールに1分間浸した。その後7.5%過酸化水素水に4分間浸し、再度70%エタノールに1分間浸した。最後に滅菌水に浸すことで種子を洗浄した。この種子は、表6-1に示すHoagland培地[4]を改良し作成した寒天培地上に設置し、25°Cで培養することで発芽させた。発芽したホワイトクローバーは、以後、JAEA 構内および福島県川俣町において採取した土壌に移し、人工気象器内で栽培した。栽培後、土壌部分をほぐし、根の周囲の土壌を落とした。水道水で満たした容器に個体を入れて、根の周囲の土壌を全て落とした。この洗浄操作を数回繰り返したのち、最後に超純水で数回洗った（図6-1）。次に根を

表 6-2 PCR サイクルの反応温度

	プロトコル[6]	2 ステップサイクル	3 ステップサイクル
初回熱変性	94°C, 4min	94°C, 2min	94°C, 2min
熱変性	94°C, 45sec	98°C, 10sec	98°C, 10sec
アニーリング反応	55°C, 45sec	–	54°C, 30sec
伸長反応	72°C, 2min	68°C, 90sec	68°C, 90sec
サイクル回数	35 回	35 回	35 回
最終伸長反応	72°C, 10min	68°C, 10min	68°C, 10min

70%エタノールに1分間浸した。その後、7.5%過酸化水素水に4分間浸し、再度70%エタノールに1分間浸した。最後に滅菌水に浸すことで根を洗浄した。表面滅菌した根は、オートクレーブ滅菌したろ紙上に置き、水分をとった。その後は火炎滅菌したメスを用いて根を切り、切片を作成した。これらの断片を1% TSA 寒天培地または1% NBA 寒天培地を用いて培養し、発現したコロニーを同じ培地に単離した。単離した微生物のコロニーをコルクボーラーで打ち抜き、CAS 寒天培地上に設置し、25°Cで培養し、シデロホア生産性のスクリーニングを行った。



図 6-1 栽培試験後のクローバー試料

6.2.3. 微生物の分類

土壌および栽培したホワイトクローバー根から単離された微生物は、DNA を抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR 法) によって 16S rRNA 遺伝子を増幅させ、得られた DNA 鎖の塩基配列から微生物の分類を行った。これらは特にシデロホア生産量が多い 17 サンプルを含むシデロホア生産微生物 70 サンプルの分類を試みた。本研究では、まず微生物からの DNA 抽出操作、PCR 法における酵素の種類、PCR サイクルの温度の検討を行った。プライマーは ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') または ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') と ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') の組み合わせ、および 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') の組み合わせを用いた[5]。なお、これらのプライマーは

北海道システム・サイエンス株式会社に外注し作成した。

微生物は、PY 液体培地 (10 g/L ペプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L NaCl、0.5 g/L MgSO₄·7H₂O) を用いて、25 °C で 3-4 日間振とう培養した。遠心分離で細胞を回収し、あらかじめ滅菌したリン酸緩衝生理食塩水を 30 mL 加え、細胞を 2 回洗浄した。

DNA 抽出操作は、ホモジナイザー粉砕による抽出操作、加熱による抽出操作、試薬溶解による抽出操作をそれぞれ検討した。ホモジナイザー粉砕による抽出操作では、Bio Masher I (株式会社ニッピ) を使用し、記載のプロトコルに従って抽出操作した。加熱による抽出操作は、2 種類を検討した。微生物の細胞に Nuclear-Free Water (プロメガ社) を添加し、かくはん後に電子レンジで 10-15 秒加熱した。もう 1 種類は、微生物の細胞に Nuclear-Free Water を添加後に、85 °C に設定した恒温槽で 30 分間加熱した。試薬溶解による抽出操作では DNAzol Direct (コスモバイオ社) を使用した。微生物の細胞に DNAzol Direct を添加し、室温にて 15 分間、または 3 時間の培養を行った。PCR 法に使用する酵素として、Go Taq Green Master Mix (プロメガ社) と KOD FX Neo (東洋紡株式会社) を検討した。使用量は、それぞれ記載のプロトコルに従って行った。PCR 法は Progene PCR Thermal Cycler (Thecne 社) を用いて行った。10 μM に調整したプライマーを 1 μL ずつ、指定量の酵素、DNA 抽出サンプル 4 μL を加え、最後に、合計が 50 μL となるように Nuclease-Free Water を加え、よく混合した。PCR サイクル温度は、表 6-2 に示す。これらは、先行研究[6]および酵素のプロトコルに記載された設定を参考にした。PCR 後、PCR 産物 5 μL とローディングバッファー 1 μL を混合し、TAE 緩衝液 (40 mM Tris 塩基、20 mM 酢酸、1 mM EDTA·2Na) に 1%アガロースを加えて作成したゲルに導入し電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを 0.5 μg/ml のエチジウムブロマイドを含む TAE 緩衝液に 3-5 分間浸し、紫外線照射した。PCR 増幅したサンプルは、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製を行った。精製後の PCR 産物 5 μL とローディングバッファー 1 μL を混合し、TAE 緩衝液に 1%アガロースを加えて作成したゲルに導入し電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを 0.5 μg/ml のエチジウムブロマイドを含む TAE 緩衝液に 3-5 分間浸し、紫外線照射した。PCR 産物の精製を確認した後、PCR 反応物の塩基配列の解析を行った。塩基配列の解析は株式会社ベックスへの外注により行った。得られた塩基配列波形データをもとに、NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースによる BLAST 解析を行った。

6.3. 結果と考察

6.3.1. 土壌中のシデロホア生産微生物の単離

各土壌サンプルから 456 サンプルずつ、合計 912 サンプルの単離を行った。直径の比が 1 以上のものが、シデロホア生産能力を持つ微生物と判断される[5]。これらのサンプルの

CAS 培地での培養によってシデロホアの生産能力が確認できたものは、JAEA 構内土壌で 135 サンプル (29.6%)、および福島県川俣町土壌で 72 サンプル (15.8%) であった。シデロホアの生産量を示すオレンジ色の部分の直径と微生物のコロニーの大きさを用いて、特にシデロホア生産量の多い微生物を 17 サンプル選定した (JAEA 構内土壌; 15 サンプル、福島県川俣町土壌; 2 サンプル)。土壌に生息するシデロホア生産微生物の割合は、13% から 85% など幅広い報告がある [7-9]。また、シデロホア生産微生物のスクリーニングに使用した CAS 培地は一部の微生物種に対して生育阻害を及ぼすことも指摘されている [10, 11]。

6.3.2. ホワイトクローバーに共生するシデロホア生産微生物の単離

クローバー根切片から単離した微生物は、JAEA 構内土壌で栽培したクローバー根中から 211 サンプル、福島県川俣町土壌で栽培したクローバー根中から 140 サンプルであった。これらのサンプルのうち、CAS 培地での培養によってシデロホアの生産能力が確認できたものは、JAEA 構内土壌で栽培したクローバー根中から 8 サンプル (3.8%)、および福島県川俣町土壌栽培したクローバー根中から 20 サンプル (14.3%) であった。植物根内のシデロホア生産微生物の存在割合として、コシアブラ根においては 23.1% と報告があり [5]、今回の結果よりも高い値となっている。一方、マメ科植物の根中のシデロホア生産微生物の割合は 17% [12]、落花生においては 3.2% [13] であり、存在割合に関して幅広い報告がある。この傾向は本研究においても同様であった。

6.3.3. 微生物の分類

DNA 抽出操作の検討は、ホモジナイザー粉碎による抽出操作、加熱による抽出操作 (電子レンジによる加熱、恒温槽による加熱)、試薬溶解による抽出操作 (反応時間が 15 分間および 3 時間) をそれぞれ検討した。ホモジナイザー粉碎による抽出操作では PCR 法による DNA の増幅は見られなかった。加熱による抽出操作では、恒温槽を用いて 85°C で 30 分間加熱した場合においてのみ PCR による DNA の増幅が見られた。試薬溶解による抽出操作では、反応時間を 3 時間にすることで PCR 法による DNA の増幅が見られた。以上より、DNA 抽出操作として、恒温槽を用いた 85°C での 30 分間の加熱操作、もしくは試薬 (DNAzol Direct) による 3 時間の室温培養操作が有効である。

PCR 法に使用する酵素は、2 種類 (Go Taq Green Master Mix と KOD FX Neo) を検討した。恒温槽を用いた 85°C での 30 分間の加熱操作、もしくは試薬 (DNAzol Direct) による 3 時間の室温培養操作にて抽出した DNA を PCR させた (図 6-2)。#5、6、11、12 において PCR 反応物が確認できた。これより、プライマーの組み合わせとして 27F と 1492R が適切であることがわかる。これらの中でも、#12 の PCR 反応物のバンドが最も強く現れていた。以上より、本研究における PCR は、DNA 抽出法は試薬 (DNAzol Direct) による 3 時間の室温培養操作、酵素は KOD FX Neo を用いることとする。KOD FX Neo は、PCR サイクルの反応温度のプロトコルが 2 種類 (2 ステップサイクルと 3 ステップサイクル) 存在

表 6-3 PCR に用いた微生物の一覧

No.	微生物	No.	微生物	No.	微生物
1	STF106	25	RNF34	49	RNF16
2	SNJ137	26	NC4-34	50	RTF47
3	STJ172	27	RNF5	51	RNJ54
4	STJ26	28	RNF33	52	RTF46
5	TC4-6	29	STJ214	53	RNJ60
6	RTF70	30	RNF23	54	STJ71
7	RNJ15	31	RTF59	55	RTF67
8	NC4-36	32	RNJ66	56	RTF21
9	SNJ83	33	RNF49	57	RNF25
10	RTJ73	34	NC4-35	58	RTF72
11	STJ170	35	RTJ138	59	RTJ89
12	TC3-43	36	RNF50	60	RTJ137
13	SNJ54	37	RNF31	61	RNJ16
14	TC3-38	38	RNF28	62	RNJ17
15	TC4-9	39	STJ136	63	RNF1
16	RTJ84	40	STJ81	64	RNF8
17	SNF193	41	SNJ50	65	RNF9
18	TC3-12	42	TC4-10	66	RNF29
19	STJ144	43	NC3-17	67	RNF38
20	RNF22	44	TC4-8	68	RTJ9
21	SNJ48	45	STJ61	69	RTJ97
22	RTJ1	46	RTF73	70	RTJ98
23	STJ192	47	RNF20		
24	RNF21	48	RTF71		

する。2ステップサイクルは簡便な PCR サイクルで、アニーリングのための冷却を必要としないものである。3ステップサイクルは通常の PCR サイクルである。2種類の反応温度で PCR した。2ステップサイクルでは PCR 反応物が確認できず、3ステップサイクルにおいてのみ PCR 反応物が確認できた。以上より、PCR サイクルは3ステップサイクルに決定する。

使用したプライマー-27F と 1492R はおよそ 1500 bp の長さをもつ 16S rRNA 領域の 8-27 および 1492-1512 のポジションに対して働くため、期待される PCR 反応物の長さは、およ

そ 1500 bp と推測できる。図 6-2 の電気泳動の結果から、得られた PCR 反応物の長さはおよそ 1500 bp であることがわかる。以上より、上記の PCR プロトコルによって精製された PCR 反応物は 16S rRNA 領域のものであると考えられる。

PCR 法に供した微生物を表 6-3 に示した。また、これらの微生物の PCR 反応物の電気泳動の結果を示す (図 6-3)。PCR を行った 70 サンプル (#1-70) のうち、#2、#7、#13、#14、#15、#18、#21、#26、#28、#29 は PCR により増幅した反応物は観察されなかった。また、PCR 反応物の精製後の電気泳動パターンを図 6-4 に示す。#55 以外のすべてのサンプルにおいて、PCR 反応物が精製されていることが確認できた。

これらの PCR 反応物の塩基配列を用いて行った、NCBI データベースによる微生物の分類の結果を表 6-4 に示す。近隣接合法により作成した微生物の 16S rRNA 領域の塩基配列の系統樹を図 6-5 に示す。福島県川俣町土壌から単離されたシデロホア生産量の多い微生物は、*Pseudomonas* 属であった。JAEA 構内土壌から単離されたシデロホア生産量の多い微生物は *Bacillus* 属と *Pseudomonas* 属であった。一方、福島県川俣町土壌の栽培試験によっ

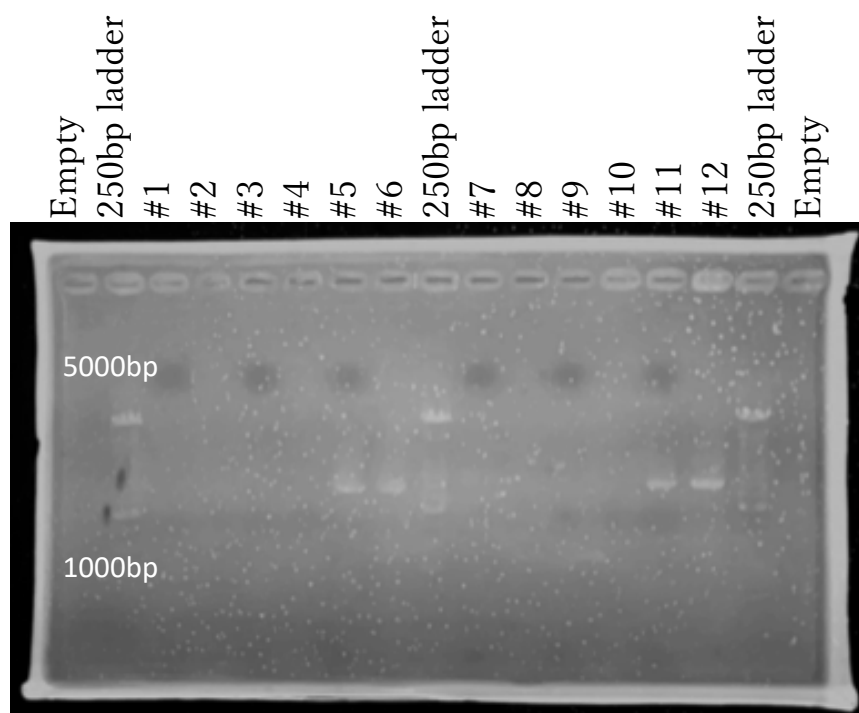


図 6-2 PCR における各条件 (DNA 抽出法、プライマー、酵素) の検討結果。#1-#6 は加熱操作による DNA 抽出法、#7-#12 は試薬による DNA 抽出法。#1、2、7、8 は ITS5 と ITS4、#3、4、9、10 は ITS1 と ITS4、#5、6、11、12 は 27F と 1492R のプライマーを使用。奇数番号は KOD FX Neo を、偶数番号は Go Taq Green Master Mix の酵素を使用。

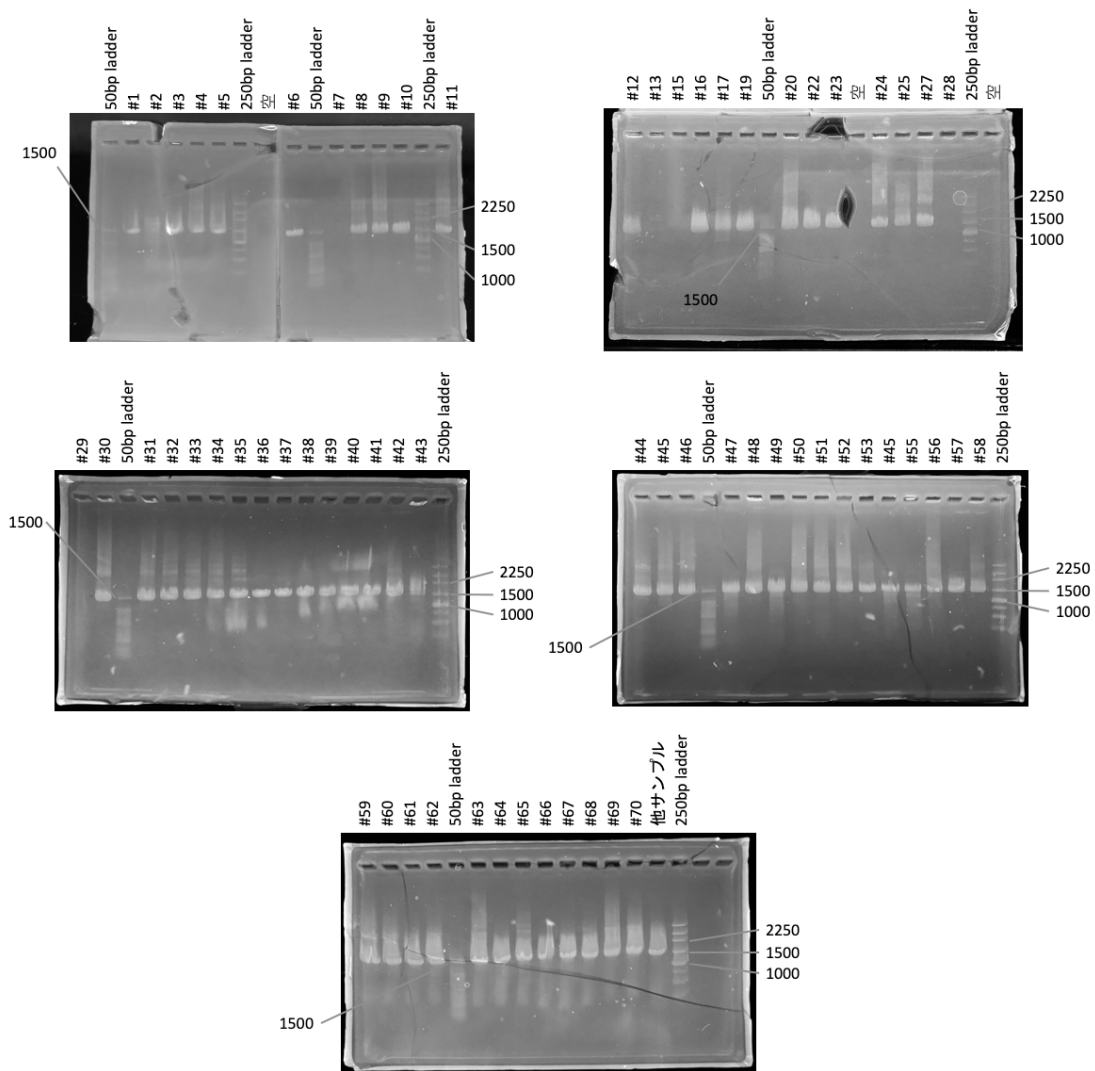


図 6-3 PCR 反応物を電気泳動した結果

て得られたクローバー根中のシデロホア生産微生物は、*Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属と *Duganella* 属であった。JAEA 構内土壌の栽培試験によって得られたクローバー根中のシデロホア生産微生物は、*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Burkholderia* 属、*Azospirillum* 属であった。今回 16S rRNA 遺伝子解析による分類を試みた微生物種は、いずれも土壌や植物根から分離され、シデロホアの生産が報告されている [9, 13-24]。

土壌および植物根の両方で確認された微生物は、土壌および植物根内において生息できるシデロホア生産微生物であると考えられる (*Bacillus* 属と *Pseudomonas* 属)。ただし、JAEA 構内土壌試料を用いた実験においては、*Pseudomonas* 属は土壌からは単離されたが、植物根中からは確認されなかった。これは、*Pseudomonas* 属が植物根に共生しなかった可能性

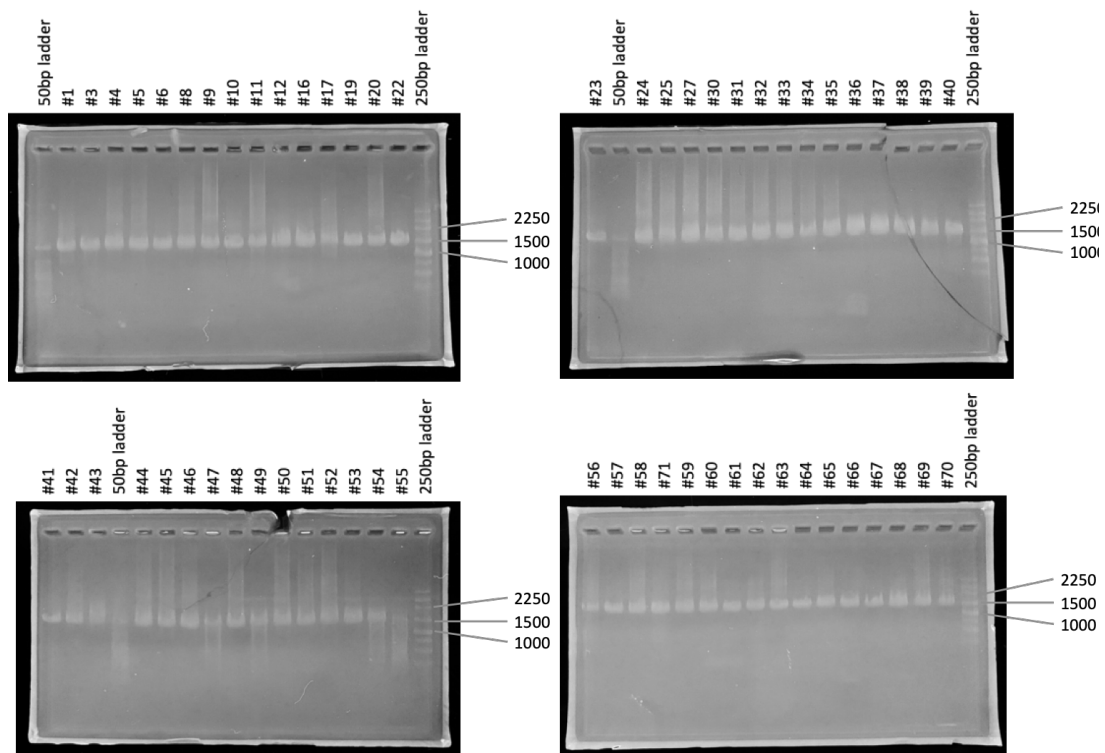


図 6-4 精製後の PCR 生産物を電気泳動した結果

が考えられる。植物の生育段階にしたがって植物根内の微生物の割合は変化する[15]。これにより、相対的に出現頻度が減ったために観察されなかった可能性も考えられる。一方、土壌では確認されなかったものの、植物根中において確認されたシデロホア生産微生物も多く存在していた。福島県川俣町の土壌を用いた実験では *Burkholderia* 属と *Duganella* 属、JAEA 構内土壌試料を用いた実験においては、*Brevibacillus* 属、*Burkholderia* 属、*Azospirillum* 属が、植物根からのみ確認された。これらの微生物は、植物根と共生することでシデロホアを生産している可能性が考えられる。植物根内と根域土壌とで、生息環境が異なると、シデロホアの生産特性が変化することが報告されている[22]。また、植物根中と土壌中では、存在する微生物の分布割合も異なることが知られており[25]、土壌においてはこれらの微生物種は相対的に少なく、土壌を用いた培養試験では出現しなかった可能性も考えられる。

表 6-4 NCBI との BLAST 解析の結果

試料	プライマー	属名	相同性 [%]	類縁種
RNF1	27F	<i>Ralstonia</i>	93.0	
	1492R	<i>Ralstonia</i>	93.0	
RNF5	27F	<i>No hits</i>		
	1492R	<i>Ralstonia</i>	82.6	
RNF8	27F	<i>Bacillus</i>	99.1	<i>Bacillus subtilis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.4	<i>Bacillus subtilis</i>
RNF9	27F	<i>Bacillus</i>	98.0	<i>Bacillus subtilis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	97.8	<i>Bacillus subtilis</i>
RNF16	27F	<i>Bacillus</i>	97.6	<i>Bacillus subtilis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	97.7	<i>Bacillus subtilis</i>
RNF20	27F	<i>Bacillus</i>	97.4	<i>Bacillus subtilis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	96.5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>Bacillus subtilis</i>
RNF21	27F	<i>Burkholderia</i>	92.9	
	1492R	<i>Burkholderia</i>	96.3	
RNF22	27F	<i>Burkholderia</i>	93.1	
	1492R	<i>Burkholderia</i>	96.4	
RNF23	27F	<i>Burkholderia</i>	90.2	
	1492R	<i>Burkholderia</i>	96.3	
RNF25	27F	<i>Bacillus</i>	98.8	<i>Bacillus toyonensis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.4	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>
RNF28	27F	<i>Bacillus</i>	98.7	<i>Bacillus megaterium</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.3	<i>Bacillus megaterium</i> <i>bacillus aryabhatai</i>
RNF29	27F	<i>Bacillus</i>	98.7	<i>Bacillus megaterium</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.2	<i>Bacillus megaterium</i>
RNF34	27F	<i>Ralstonia</i>	79.5	
	1492R	<i>Ralstonia</i>	83.4	

表 6-4 (続き) NCBI との BLAST 解析の結果

試料	プライマー	属名	相同性 [%]	類縁種
RNF38	27F	<i>Duganella</i>	98.0	
	1492R	<i>Duganella</i>	97.8	
RNF49	27F	<i>Pseudomonas</i>	96.5	
	1492R	<i>Pseudomonas</i>	97.1	<i>Pseudomonas kribbensis</i> , <i>Pseudomonas reinekei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
RNF50	27F	<i>Bacillus</i>	98.5	<i>Bacillus megaterium</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.5	<i>Bacillus megaterium</i>
RNJ16	27F	<i>Brevibacillus</i>	98.2	<i>Brevibacillus brevis</i>
	1492R	<i>Brevibacillus</i>	98.6	<i>Brevibacillus brevis</i>
RNJ17	27F	<i>Brevibacillus</i>	98.0	<i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Brevibacillus formosus</i>
	1492R	<i>Brevibacillus</i>	98.0	<i>Brevibacillus brevis</i>
RNJ54	27F	<i>Brevibacillus</i>	95.4	
	1492R	<i>Brevibacillus</i>	94.7	<i>Brevibacillus brevis</i>
RNJ60	27F	<i>Bacillus</i>	96.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus toyonensis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.4	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i>
RNJ66	27F	<i>Bacillus</i>	95.3	
	1492R	<i>Bacillus</i>	95.7	
RTF21	27F	<i>Ralstonia</i>	98.5	<i>Ralstonia pickettii</i>
	1492R	<i>Ralstonia</i>	97.9	<i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Ralstonia mannitolilytica</i>
RTF46	27F	<i>Ralstonia</i>	87.4	
	1492R	<i>Ralstonia</i>	94.5	
RTF47	27F	<i>Ralstonia</i>	88.7	
	1492R	<i>Ralstonia</i>	93.7	
RTF59	27F	<i>Ralstonia</i>	97.5	<i>Ralstonia pickettii</i>
	1492R	<i>Ralstonia</i>	93.3	

表 6-4 (続き) NCBI との BLAST 解析の結果

試料	プライマー	属名	相同性 [%]	類縁種
RTF70	27F	<i>Ralstonia</i>	98.4	<i>Ralstonia pickettii</i>
	1492R	<i>Ralstonia</i>	97.9	<i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Ralstonia mannitolilytica</i>
RTF71	27F	<i>Ralstonia</i>	98.1	<i>Ralstonia pickettii</i>
	1492R	<i>Ralstonia</i>	97.3	<i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Ralstonia mannitolilytica</i>
RTF72	27F	<i>Ralstonia</i>	97.8	
	1492R	<i>Ralstonia</i>	96.8	
RTF73	27F	<i>Burkholderia</i>	95.4	
	1492R	<i>Burkholderia</i>	95.5	
RTJ1	27F	<i>Bacillus</i>	98.4	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus toyonensis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	97.9	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i>
RTJ9	27F	<i>Azospirillum</i>	98.0	
	1492R	<i>Azospirillum</i>	99.2	<i>Azospirillum lipoferum</i>
RTJ73	27F	<i>Bacillus</i>	98.5	<i>Bacillus acidicer</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.0	<i>Bacillus acidicer</i>
RTJ84	27F	<i>Brevibacillus</i>	99.0	<i>Brevibacillus brevis</i>
	1492R	<i>Brevibacillus</i>	97.8	<i>Brevibacillus brevis</i>
RTJ89	27F	<i>Burkholderia</i>	98.3	<i>Burkholderia caribensis</i>
	1492R	<i>Paraburkholderia</i>	97.0	<i>Burkholderia caribensis</i>
RTJ97	27F	<i>Paenibacillus</i>	83.8	
	1492R	<i>Paenibacillus</i>	79.0	
RTJ98	27F	<i>Paenibacillus</i>	72.8	
	1492R	<i>Aeromonas hydrophila</i>	73.9	
RTJ137	27F	<i>Burkholderia</i>	97.5	<i>Burkholderia caribensis</i>
	1492R	<i>Burkholderia</i>	97.3	<i>Burkholderia caribensis</i>
RTJ138	27F	<i>Bacillus</i>	95.0	
	1492R	<i>Bacillus</i>	95.3	

表 6-4 (続き) NCBI との BLAST 解析の結果

試料	プライマー	属名	相同性 [%]	類縁種
SNJ50	27F	<i>Bacillus</i>	98.6	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus proteolyticus</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.6	<i>Bacillus cereus</i>
SNJ83	27F	<i>Pseudomonas</i>	87.3	
	1492R	<i>Pseudomonas</i>	80.3	
STJ136	27F	<i>Pseudomonas</i>	98.1	<i>Pseudomonas putida</i>
	1492R	<i>Pseudomonas</i>	97.5	<i>Pseudomonas umsongensis</i> , <i>Pseudomonas baetica</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
STJ144	27F	<i>Bacillus</i>	98.6	<i>Bacillus cereus</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.2	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i>
STJ170	27F	<i>Bacillus</i>	76.8	
	1492R	<i>Bacillus</i>	76.4	
STJ172	27F	<i>Bacillus</i>	98.5	<i>Bacillus cereus</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.4	<i>Bacillus cereus</i>
STJ192	27F	<i>Bacillus</i>	98.3	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.1	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i> , <i>Bacillus proteolyticus</i>
STJ26	27F	<i>Bacillus</i>	96.9	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.0	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i>
STJ61	27F	<i>Pseudomonas</i>	93.4	
	1492R	<i>Pseudomonas</i>	95.3	
STJ71	27F	<i>Bacillus</i>	98.5	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	98.6	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>

表 6-4 (続き) NCBI との BLAST 解析の結果

試料	プライマー	属名	相同性 [%]	類縁種
STJ81	27F	<i>Bacillus</i>	97.9	<i>Bacillus cereus</i>
	1492R	<i>Bacillus</i>	97.9	<i>Bacillus oryzaecorticis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus toyonensis</i>
SNF193	27F	<i>Variovorax</i>	85.2	
	1492R	<i>Variovorax</i>	93.8	
STF106	27F	<i>Pseudomonas</i>	97.9	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
	1492R	<i>Pseudomonas</i>	97.5	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>

(a)

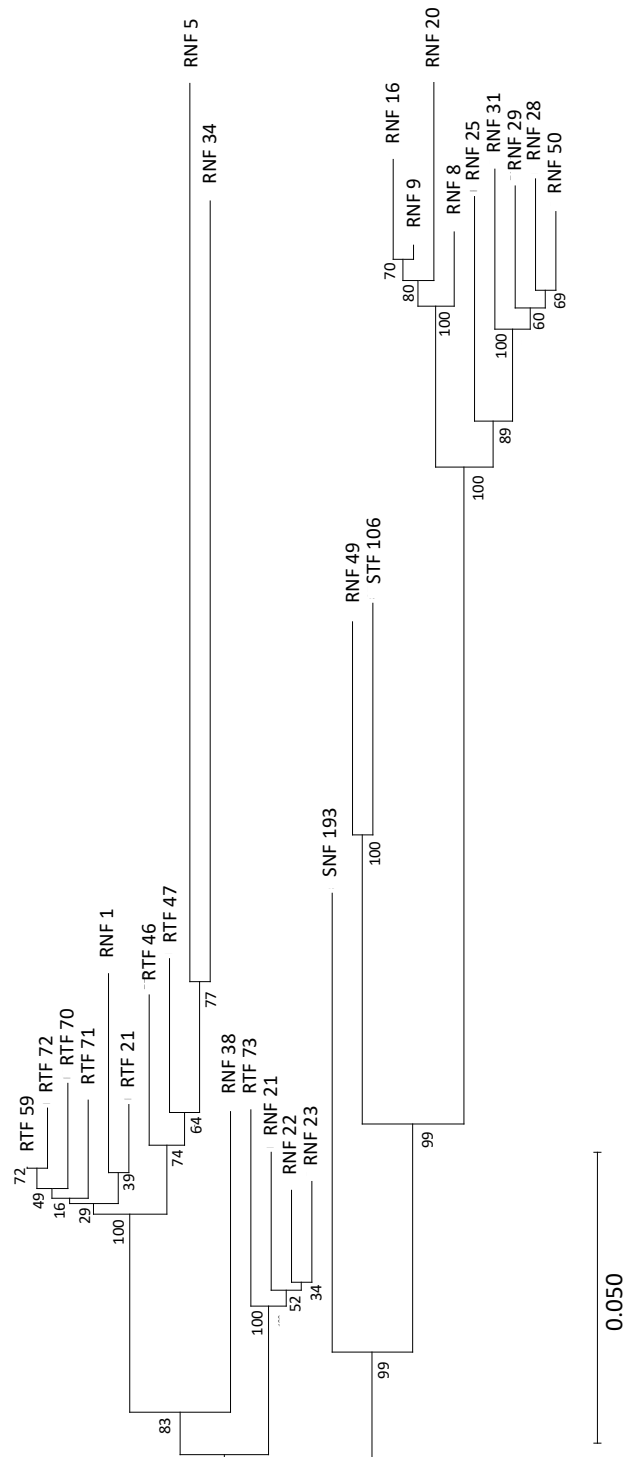


図 6-5 塩基配列解析を行なった微生物の近隣接合法による系統樹。(a)は福島県土壤試料由来の微生物である。

(b)

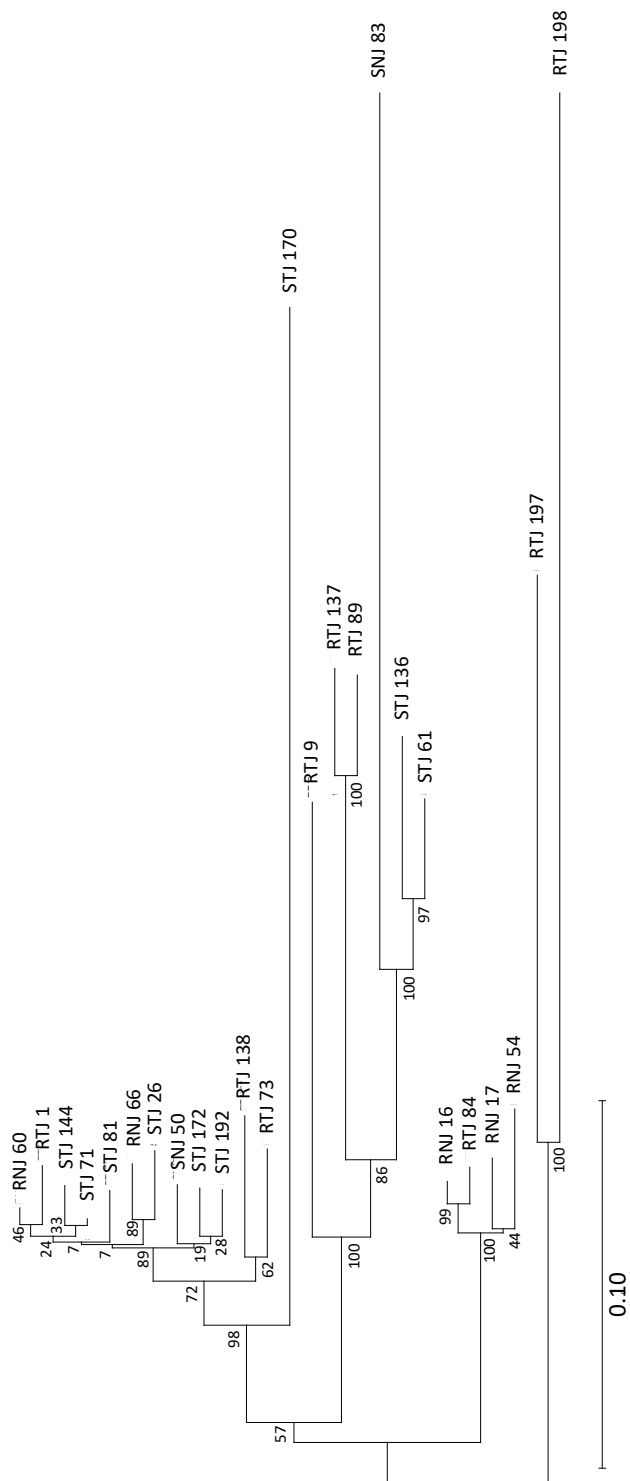


図 6-5 (続き) 塩基配列解析を行なった微生物の近隣接合法による系統樹。(b)は構内JAEA 土壌由来の微生物である。

6.4. まとめ

土壌中のシデロホア生産微生物と、土壌で栽培したクローバーの根に共生した微生物の比較を通じて、環境中におけるシデロホア生産微生物の共生関係に関する検討を行った。その結果得られた主な知見は以下の通りである。

(1) 土壌試料からシデロホア生産微生物を単離した。これらは 16S rRNA 遺伝子解析により、*Pseudomonas* 属と *Bacillus* 属と分類した。

(2) 滅菌したホワイトクローバーの種子を栽培し、根中に生息しているシデロホア生産微生物を単離した。これらは 16S rRNA 遺伝子解析により、*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Burkholderia* 属、*Azospirillum* 属、*Duganella* 属と分類した。

(3) *Pseudomonas* 属と *Bacillus* 属は土壌試料および栽培根において確認され、根域および根中でシデロホアを生産する可能性が指摘された。また、土壌と栽培根における微生物種の違いは、相対的な濃度の違いおよび生息環境によるシデロホア生産特性の違いが原因と推察される。

参考文献

1. Ishizawa, S., et al., *Studies on microbial population in the rhizosphere of higher plants with special reference to the method of study*. Soil Science and Plant Nutrition, 1957. **3**(1): p. 85-94.
2. 辻村 克良, 渡辺 巖, *根粒菌の宿主根圏での増殖について : 根粒菌の土壌中での生態に関する研究(第3報)*. 日本土壌肥科学雑誌, 1960. **31**(4): p. 173-176.
3. Alexander, D. and D. Zuberer, *Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria*. Biology and Fertility of soils, 1991. **12**(1): p. 39-45.
4. Hoagland, D.R., A.R. Davis, and J.C.M. Assistance of, *The Composition of the Cell Sap of the Plant in Relation to the Absorption of Ions*. J Gen Physiol, 1923. **5**(5): p. 629-46.
5. Yamaji, K., et al., *Root endophytic bacteria of a (137)Cs and Mn accumulator plant, Eleutherococcus sciadophylloides, increase (137)Cs and Mn desorption in the soil*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 112-119.
6. San Mauro, D., M. Garcia-Paris, and R. Zardoya, *Phylogenetic relationships of discoglossid frogs (Amphibia:Anura:Discoglossidae) based on complete mitochondrial genomes and nuclear genes*. Gene, 2004. **343**(2): p. 357-66.
7. Pahari, A. and B. Mishra, *Characterization of siderophore producing Rhizobacteria and Its effect on growth performance of different vegetables*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2017. **6**(5): p. 1398-1405.
8. Chaiharn, M., S. Chunnaleuchanon, and S. Lumyong, *Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **25**(11): p. 1919-1928.
9. Tian, F., et al., *Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere*. Brazilian Journal of Microbiology, 2009. **40**: p. 276-284.
10. Schwyn, B. and J.B. Neilands, *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Analytical Biochemistry, 1987. **160**(1): p. 47-56.
11. Milagres, A.M., A. Machuca, and D. Napoleao, *Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay*. Journal of Microbiological Methods, 1999. **37**(1): p. 1-6.
12. Rajat Maheshwari, N.B., Pooja Suneja, *Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from Cicer arietinum and Pisum sativum plants*. 1969. 7-14.
13. Wang, S., et al., *Screening and diversity of plant growth promoting endophytic bacteria from peanut*. African Journal of Microbiology Research, 2013. **7**(10): p. 875-884.
14. Gupta, A. and M. Gopal, *Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria*.

- Indian Journal of Agricultural Research, 2008. **42**(2): p. 153-156.
15. Loaces, I., L. Ferrando, and A.F. Scavino, *Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice*. Microbial ecology, 2011. **61**(3): p. 606-618.
 16. Mendes, R., et al., *Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates*. Applied and environmental microbiology, 2007. **73**(22): p. 7259-7267.
 17. Münzinger, M., et al., *S, S-rhizoferrin (enantio-rhizoferrin)–a siderophore of Ralstonia (Pseudomonas) pickettii DSM 6297–the optical antipode of R, R-rhizoferrin isolated from fungi*. Biometals, 1999. **12**(2): p. 189-193.
 18. Naureen, Z., et al., *Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of maize grown in Indonesian and Pakistani soils*. Journal of Basic Microbiology, 2005. **45**(6): p. 447-459.
 19. Sarode, P., et al., *Screening for siderophore producing PGPR from black cotton soils of North Maharashtra*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2007. **1**(1): p. 96-105.
 20. Sheng, M., et al., *Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria Brevibacillus brevis GZDF3 of Pinellia ternata and Its Antifungal Effects on Candida albicans*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020. **30**(5): p. 689-699.
 21. Sun, L., et al., *Endophytic bacterial diversity in rice (Oryza sativa L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis*. Microbial ecology, 2008. **55**(3): p. 415-424.
 22. Tortora, M.L., J.C. Díaz-Ricci, and R.O. Pedraza, *Azospirillum brasilense siderophores with antifungal activity against Colletotrichum acutatum*. Archives of microbiology, 2011. **193**(4): p. 275-286.
 23. Zhang, J., et al., *Duganella ginsengisoli sp. nov., isolated from ginseng soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016. **66**(1): p. 56-61.
 24. Münzinger, M., K. Taraz, and H. Budzikiewicz, *Staphyloferrin B, a citrate siderophore of Ralstonia eutropha*. Zeitschrift für Naturforschung C, 1999. **54**(11): p. 867-875.
 25. Marquez-Santacruz, H., et al., *Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (Physalis ixocarpa) and their detection in the rhizosphere*. Genetics and Molecular Research, 2010. **9**(4): p. 2372-2380.

第7章 粘土鉱物とシデロホア生産微生物の培養試験

7.1. はじめに

微生物活動と粘土鉱物との関係を考える場合、溶出した元素は微生物への収着を考慮する必要がある[1, 2]。また、環境中においてシデロホア生産微生物がシデロホアを生産し、鉱物中の元素を溶出させているのかどうかは重要な問題である。そこで本章では上記の内容に関して、実験的観察による検討を試みる。

7.2. 実験方法

粘土鉱物の共存下でシデロホア生産微生物の培養試験を行い、粘土鉱物からの元素溶出（溶解効果）を検討した。実験に用いる微生物は、*Pseudomonas* 属（TC4、NC4）と *Xanthomonas* 属（TC3）の3種類で、いずれも CAS 培地におけるシデロホア生産能力のスクリーニングにおいてシデロホア生産性を示した微生物である。実験に用いる培地は、鉄やアルミニウムなどを含まない合成培地が必要である。そこで、*Pseudomonas* 属を含む多くの種の微生物培養に使用されており、鉱物の主要構成元素を含まない最小培地[3]を改変し、使用した。使用した培地の組成は、1L あたり 0.02g KCl、0.55g Glycerol 2-phosphate disodium、0.065g (NH₄)₂SO₄、0.1g KNO₃、0.02g CaCl₂、2.0g グルコース、10mM HEPES であり、pH は 7.0 に調整した。

粘土鉱物は黒雲母とバーミキュライト、イライトを使用した。これらは、湿式粉碎を行い、75 μm 以下に粉碎した。粉碎した粘土鉱物は、超純水で洗浄後、エタノールで懸濁させ、クリーンベンチ内で風乾した。微生物は 50% Tryptic Soy Broth 液体培地で 12-18 時間、25°C で前培養した。その後、PY 液体培地（10 g/L ペプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L NaCl、0.5g/L MgSO₄·7H₂O）で 3-4 日間、25°C で培養した。遠心分離により微生物細胞を回収し、滅菌した 0.9%NaCl で 3 回洗浄した。その後、滅菌した最小培地で再懸濁した。

微生物懸濁液は、微生物量が 50 mg-dry となるように乾熱滅菌した三角フラスコに加えた。ここに粘土鉱物を 100 mg 加え、最小培地を 100 mL 加えた。これらは 25°C で培養した。培養を開始して、2-4 時間後、1、2、7 日後にサンプリングを行った。サンプリングは、粘土鉱物を含む培養液を 10 mL 取り、遠心分離した。その後、上澄み液を 0.20 μm シリンジフィルターでろ過した。残渣には新しい培地を 10mL 加え、再懸濁させた。この懸濁液を、元の培養液に合わせて、培養試験を継続した。各サンプル試料中の鉄、アルミニウム、ケイ素の濃度を ICP-OES で測定した。また、溶液中に生産されたシデロホアがどのような状態で存在しているのかを調べるために、7 日目にサンプリングしたサンプルを、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と ICP-OES とを組み合わせた測定（HPLC-ICP-OES 測定）を行った[4, 5]。ICP-OES への導入前に HPLC を使用することにより、HPLC によって分離されたフラクションの元素分析を直接に行うことができる。HPLC カラムは Superdex 75

increase (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いた。HPLC は SEC モードで運転し、移動相は 10 mM Tris-HCl buffer (pH=7.0)、流量は 1.0 mL/min、カラムオープン温度は 25°C とした。サンプルは 100 μ L をアプライした。HPLC の検出器は UV-vis を使用した。ICP-OES は鉄とアルミニウムの測定を行った。また、微生物の生産したシデロホアのピークを特定するために、微生物の生産したシデロホア溶液に第二鉄を混合したサンプルの HPLC-ICP-OES 測定を行った。

7.3. 結果と考察

7.3.1. 粘土鉱物とシデロホア生産微生物の培養試験

黒雲母と共に培養した培養試験の結果を図 7-1 に、イライトと共に培養した培養試験の結果を図 7-2 に、バーミキュライトと共に培養した培養試験の結果を図 7-3 に示す。黒雲母と共に培養した培養試験では、微生物によって、元素濃度の変化の傾向は大きく異なっていた。TC4 を用いた培養試験においては、培養開始直後の 2 時間から 4 時間後の時点においては鉄、アルミニウム、ケイ素のいずれの元素においてもブランク試験より高い濃度であった。鉄は培養時間が長くなるとその差は見られなくなった。アルミニウムとケイ素は、2 日目以降は、ブランク試験と同様の増加傾向を示した。TC3 を用いた培養試験においては、培養を開始してから 1 日目まではブランク試験よりやや高い濃度であったが、2 日目ではブランク試験より大きくなった。2 日目までの増加の様子は鉄、アルミニウム、ケイ素で同様の傾向であったが、7 日目は鉄のみブランク試験と同程度まで濃度が減少した。NC4 を用いた培養試験においては、培養開始から 1 日目までは鉄、アルミニウム、ケイ素の濃度は増加傾向であった。それ以降は、2 日目において大きく減少し、7 日目は 2 日目と同程度かやや減少した。培養試験における pH は培養初期段階で大きく減少し、pH4 付近であった。これは先行研究[3]においても生じている。この pH の低下は、微生物におけるグルコースの消費[3]に由来する酸の発生と考えられる。7 日目において pH が大きく変動した要因として、微生物の活動が鈍くなった、あるいは死滅したことが考えられる。鉄に関しては、いずれの微生物においても、ブランク試験よりも高い濃度が測定されたものの、7 日目にはブランク試験と同程度まで減少した。これは、微生物に吸収、利用されたためである。一方、アルミニウムとケイ素は必須元素ではないため、微生物利用による減少が見られなかったと考えられる。イライトを添加した培養試験は、黒雲母を添加した場合とは大きく異なっていた。TC4 と NC4 は似た傾向が観察された。鉄は培養開始後 1 日目および 2 日目においてブランク試験よりも高く、7 日目では同程度か低くなった。アルミニウムは培養開始から 2 日目まではブランク試験よりも低く、7 日目では同程度か低くなった。ケイ素はアルミニウムと同様の傾向を示した。TC3 は、鉄の濃度変化は TC4 と NC4 と類似していた。しかし、アルミニウムとケイ素では大きく異なっており、7 日目においてブランク試験よりも

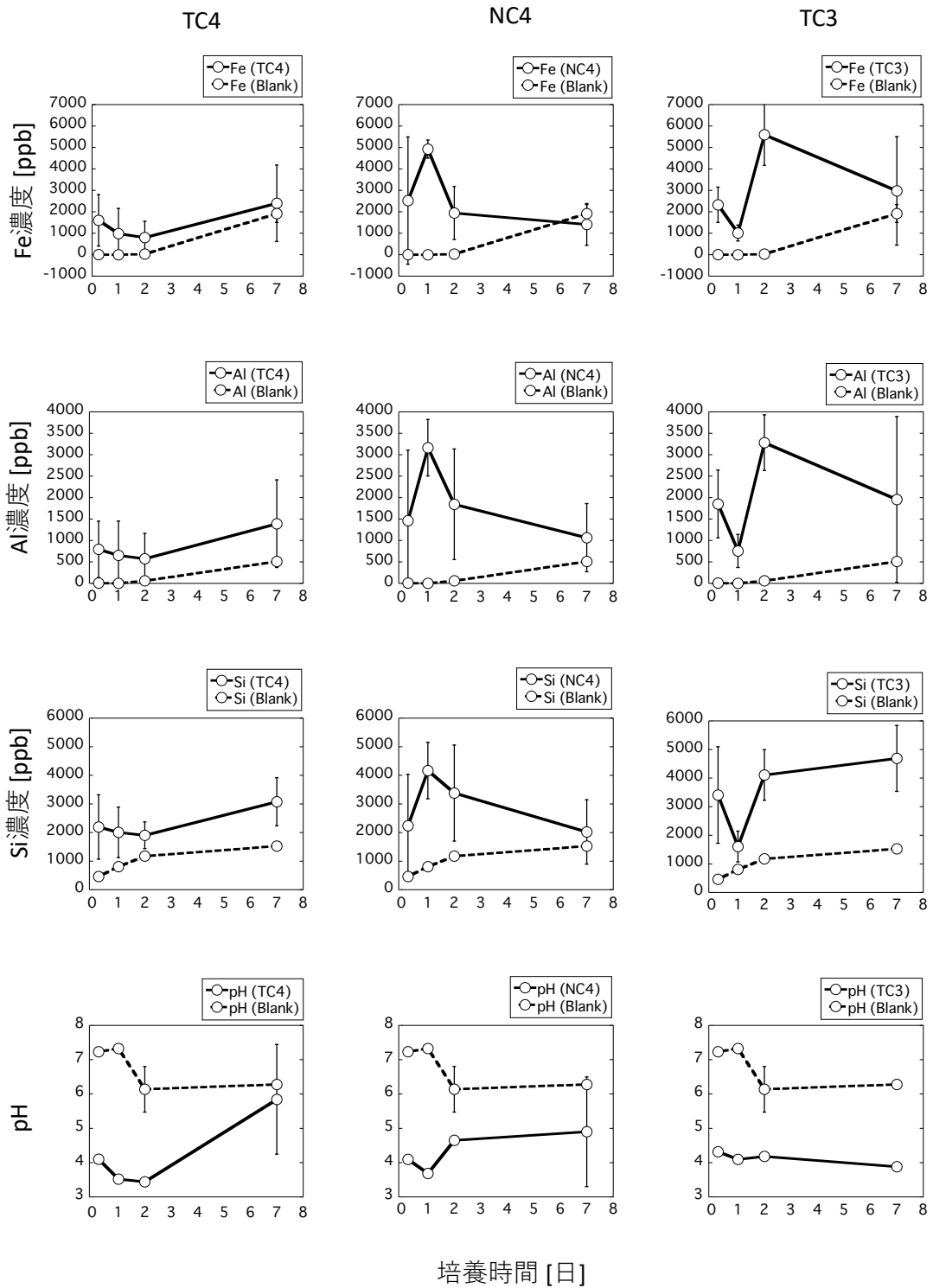


図 7-1 黒雲母を添加した培地での培養試験における、培地中の元素濃度

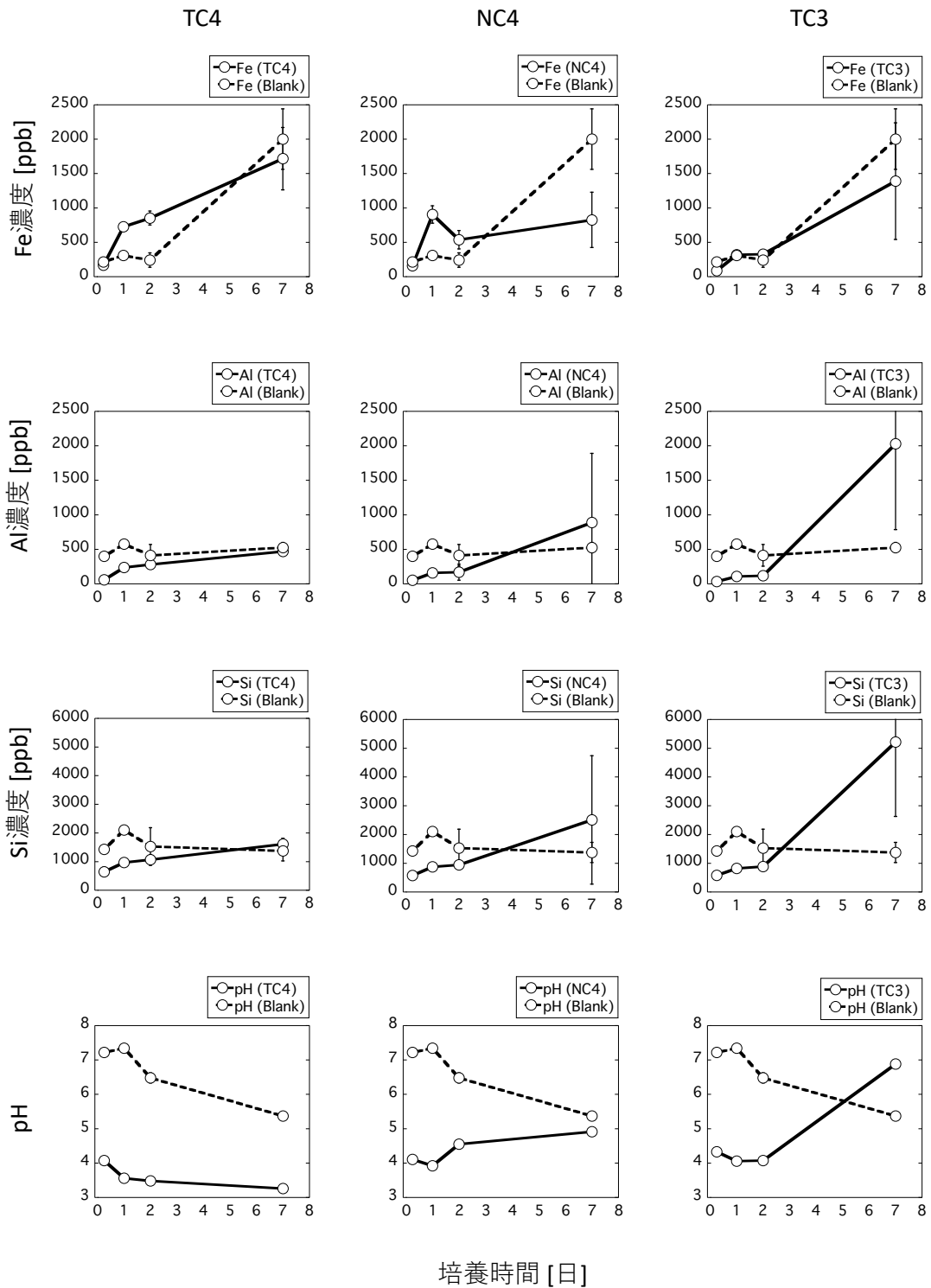


図 7-2 イライトを添加した培地での培養試験における、培地中の元素濃度

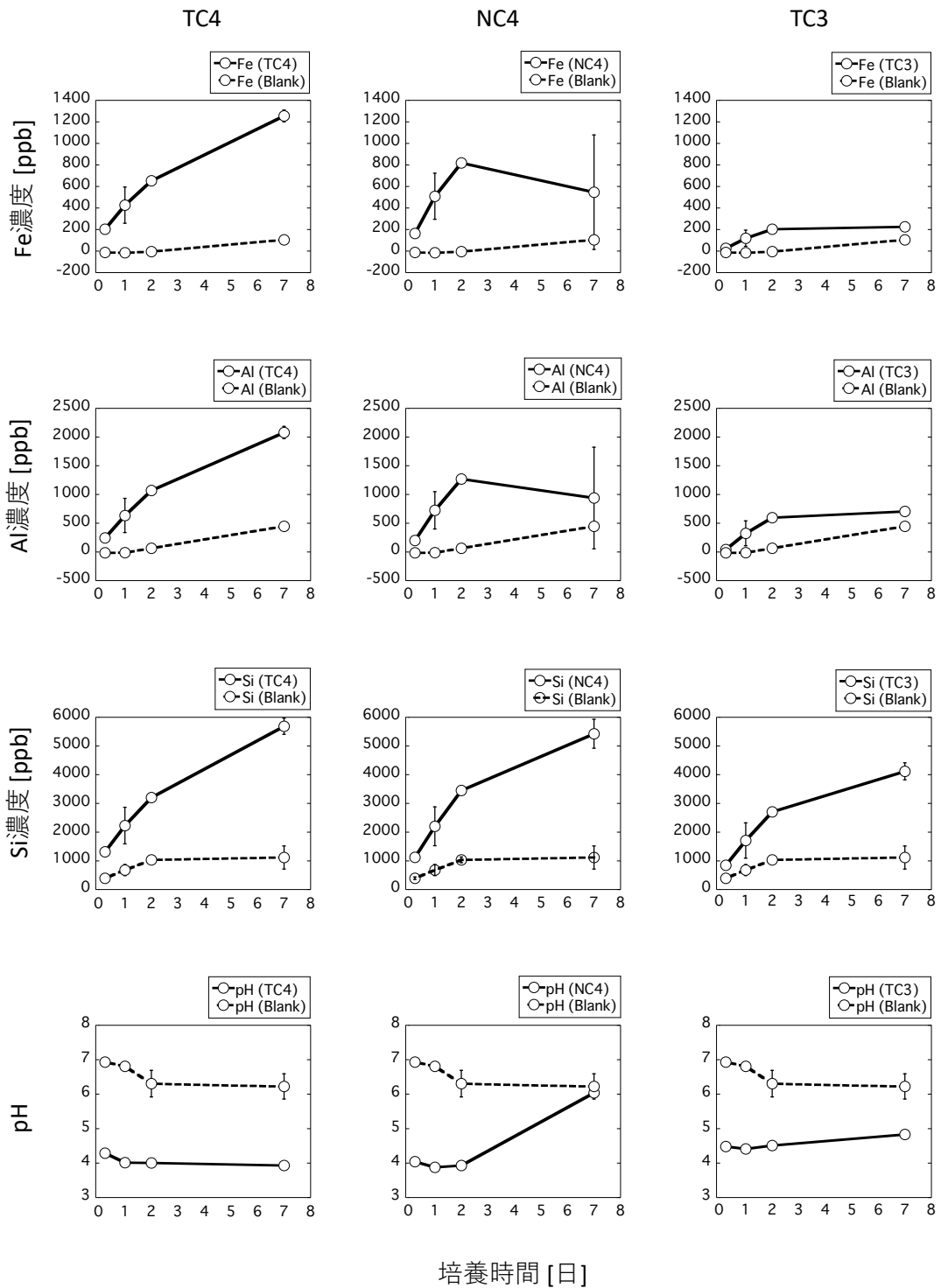


図 7-3 バーミキュライトを添加した培地での培養試験における、培地中の元素濃度

表 7-1 粘土鉱物構成元素の溶解速度。示した数字は、溶出速度[mol/m²·s]の対数值。

Biotite	Fe	Al	Si
TC4	-10.8	-11.0	-10.7
NC4	-11.0	-11.2	-10.9
TC3	-10.7	-10.9	-10.5
Blank	-10.9	-11.5	-11.0
Illite	Fe	Al	Si
TC4	-11.5	-12.1	-11.6
NC4	-11.8	-11.8	-11.4
TC3	-11.6	-11.5	-11.0
Blank	-11.5	-12.0	-11.6
Vermiculite	Fe	Al	Si
TC4	-11.1	-11.0	-10.5
NC4	-11.5	-11.3	-10.5
TC3	-11.9	-11.4	-10.7
Blank	-12.3	-11.6	-11.2

高くなった。pH は、黒雲母を添加した培養試験と同様、培養開始後から pH は 4 付近であった。TC3 のみ 7 日目において pH が増加した。バーミキュライトを添加した培養試験では、全体的には培養期間の経過とともに溶出量が増加する傾向が見られた。TC4 は特に顕著で、培養開始直後（2-4 時間後）と 7 日後を比較すると、鉄、アルミニウム、ケイ素の濃度はそれぞれおよそ 6 倍、10 倍、4 倍に増加した。TC3 は、TC4 と比較すると濃度の増加量は少ないものの、培養期間の経過とともに溶出量も増加しており、TC4 と同様の傾向であった。NC4 は鉄、アルミニウムにおいて、7 日目の濃度が 2 日目と比べて同程度か減少した。pH は、NC4 のみ 7 日目において増加した。バーミキュライトは、微生物の活動により鉄、アルミニウム、ケイ素の濃度が増加したと言える。

7 日目における各鉱物の元素ごとの溶解速度を表 7-1 に示す。黒雲母は NC4 の鉄を除く全てにおいて、ブランク試験よりも大きくなった。イライトに関して、鉄の溶解速度はいずれもブランク試験より小さく、一方でケイ素、アルミニウムは、TC4 の鉄以外の全ての微生物および元素で、ブランク試験よりも大きくなった。バーミキュライトは全ての微生物および元素で、ブランク試験よりも大きくなった。これらはシデロホア生産微生物の活動によ

り増加したものと考えられる。一般に鉱物の溶解速度は pH の依存性を示す。培養試験で観察された pH 付近における黒雲母中の鉄の溶解速度は $10^{-11.4}$ – $10^{-10.5}$ [mol/m²·s] [6-9]、イライトの溶解速度は 10^{-14} [mol/m²·s] [10]、バーミキュライトの溶解速度は 10^{-11} [mol/m²·s][11]であると報告されている。黒雲母やバーミキュライトは pH の効果を考慮すれば、本研究で得られた溶解速度は、先行研究における報告と同程度である。一方で、イライトの溶解速度は、先行研究の報告と比較して 100 倍以上も大きい。本実験条件では、微生物自身が吸収利用した元素の量を考慮できていないため、実際の溶解速度は得られた値よりも大きくなる可能性が考えられる。

7.3.2. HPLC–ICP–OES 測定

TC4 の培養液から精製したシデロホア溶液に Fe³⁺を添加した試料の HPLC–ICP–OES 測定の結果を図 7-4 に示す。HPLC クロマトグラムに着目すると、245 nm、405 nm のいずれの波長においても、保持時間が 14.2 分に強いピークが確認できた。シデロホアは 400 nm 付近に吸収極大を持つ[12]。つまり、保持時間が 14.2 分のピークに対応するのがシデロホアと考えられる。一方、ICP-OES 側での鉄の強度に着目すると、14.2 分の位置に強度のピ

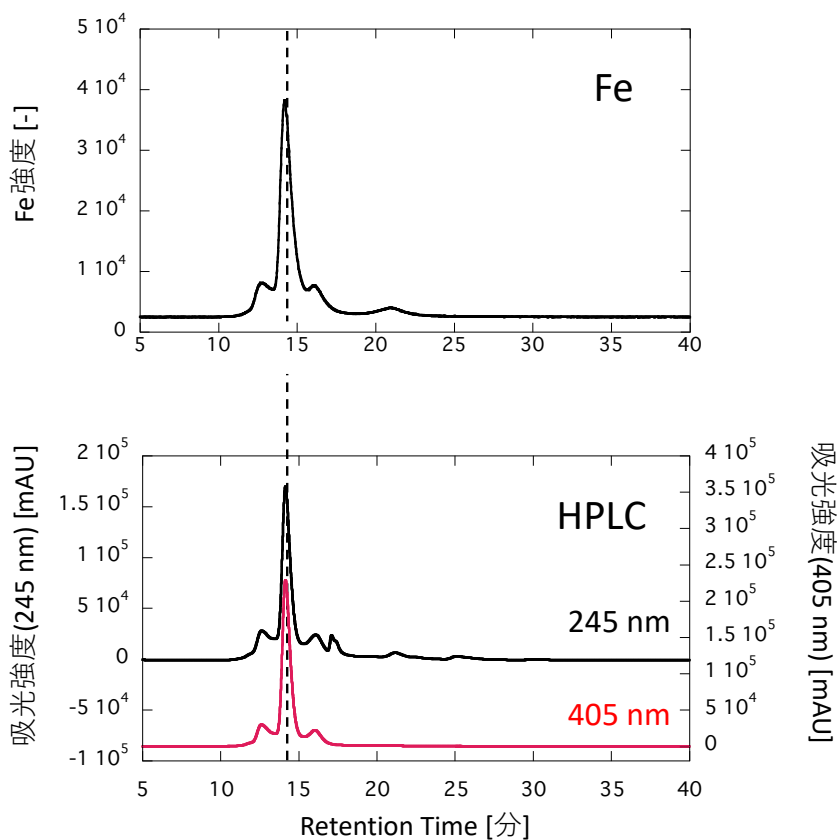


図 7-4 シデロホア–鉄錯体の HPLC–ICP–OES 測定の結果

ークが出現した。以上から、シデロホアは鉄と錯体を形成していた。

第3章で示したように、シデロホアの存在によってセシウムの溶出が比較的起こりやすい鉱物はイライトであった。そこで、イライトを添加した培養試験の内、*Pseudomonas* 属であり (TC4、NC4) かつ pH 減少による微生物の活動がよく行われていると考えられる TC4 の培養試験における7日目のサンプルを HPLC-ICP-OES 分析に供した。HPLC-ICP-OES 分析の結果を図 7-5 に示す。245 nm の HPLC クロマトグラムに着目すると、いくつかのピークが出現した。一方、405 nm の HPLC クロマトグラムに着目すると、保持時間が 14.2 分の位置にピークが出現した。シデロホア溶液のみと保持時間が一致しており、このピークはシデロホア由来のものであると考えられる。その他のピークは培地成分や他の微生物生

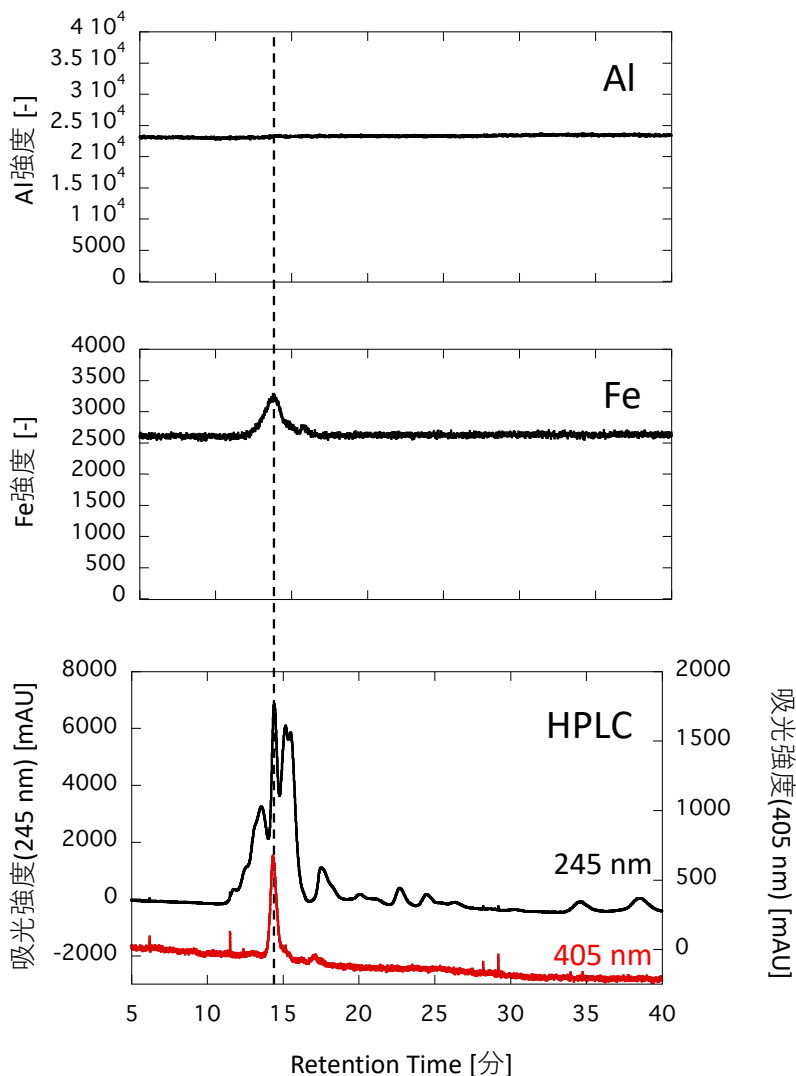


図 7-5 TC4 をイライト添加した培地で培養後、7日目の培地の HPLC-ICP-OES 測定の結果

産物に対応している。ICP-OES 側の結果では、鉄は 14.2 分の位置に強度のピークが確認され、アルミニウムはピークが出現しなかった。これは、保持時間が 14.2 分である物質には鉄が含まれていることを示している。すなわち、シデロホア生産微生物は液相中にシデロホアを生産し、それらは鉄とキレートした状態で存在していると結論づけることができる。

7.4. まとめ

本章では、微生物活動と粘土鉱物との関係において、粘土鉱物の元素の溶出挙動、および微生物によるシデロホア生産を実験的に観察にした。その結果得られた主な知見は以下の通りである。

(1) シデロホア生産微生物の活動により、粘土鉱物の構成元素の溶出が起こり、溶出した元素の一部は微生物が吸収利用した可能性が指摘された。これらの元素挙動は、微生物間、粘土鉱物により異なっていた。

(2) 液相中にはシデロホアが存在し、それらは鉄と結合していた。このことより、シデロホア生産微生物はシデロホアを生産し、粘土鉱物から鉄を溶出させていることが実験的に示された。

参考文献

1. Müller, B., *Impact of the bacterium Pseudomonas fluorescens and its genetic derivatives on vermiculite: Effects on trace metals contents and clay mineralogical properties.* Geoderma, 2009. **153**(1-2): p. 94-103.
2. Nakao, A., et al., *Cs Accumulation Behavior by Pseudomonas fluorescens.* Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences, 2005. **6**(1): p. 107-110.
3. Balland, C., et al., *Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010. **74**(19): p. 5478-5493.
4. Kozai, N., T. Ohnuki, and T. Iwatsuki, *Characterization of saline groundwater at Horonobe, Hokkaido, Japan by SEC-UV-ICP-MS: speciation of uranium and iodine.* Water Res, 2013. **47**(4): p. 1570-84.
5. Kozai, N., et al., *Complexation of Eu(III), Pb(II), and U(VI) with a Paramecium glycoprotein: Microbial transformation of heavy elements in the aquatic environment.* Chemosphere, 2018. **196**: p. 135-144.
6. Acker, J.G. and O.P. Bricker, *The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 1992. **56**(8): p. 3073-3092.
7. Kalinowski, B.E. and P. Schweda, *Kinetics of muscovite, phlogopite, and biotite dissolution and alteration at pH 1–4, room temperature.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 1996. **60**(3): p. 367-385.
8. Malmström, M. and S. Banwart, *Biotite dissolution at 25 C: The pH dependence of dissolution rate and stoichiometry.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 1997. **61**(14): p. 2779-2799.
9. Taylor, A.S., et al., *Kinetics of dissolution and Sr release during biotite and phlogopite weathering.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 2000. **64**(7): p. 1191-1208.
10. Köhler, S.J., F. Dufaud, and E.H. Oelkers, *An experimental study of illite dissolution kinetics as a function of pH from 1.4 to 12.4 and temperature from 5 to 50° C.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 2003. **67**(19): p. 3583-3594.
11. Kalinowski, B.E. and P. Schweda, *Rates and nonstoichiometry of vermiculite dissolution at 22° C.* Geoderma, 2007. **142**(1): p. 197-209.
12. Albrecht-Gary, A.-M., et al., *Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of Pseudomonas aeruginosa.* Inorganic Chemistry, 1994. **33**(26): p. 6391-6402.

第8章 シデロホア生産微生物と植物生産物とのシナジー効果

8.1. はじめに

植物と微生物は密接な関係にあり、植物-微生物間の共生関係においては、植物由来の有機酸を微生物が活用することでミネラル分の獲得などを行っている。また、有機酸の活用によるシデロホア生産能力の向上も指摘されており[1]、植物由来の有機酸がシデロホア生産能力を高め、粘土鉱物からのセシウム溶出を促進させることが考えられる。そこで本章では、植物と共生するシデロホア生産能力を持つ微生物に対して、植物が生産する有機酸がどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とし、粘土鉱物の溶解とセシウムの溶出との観点から実験を行った。

8.2. 実験方法

本章では、まずは植物の生産する有機酸の分析を行った。次に、ホワイトクローバーから単離したシデロホア生産微生物を、検出された有機酸およびセシウムを吸着させた粘土鉱物とともに培養試験に供し、粘土鉱物の主要構成元素とセシウムの溶出挙動について観察を行った。

8.2.1. 植物の生産する有機酸

植物自身が生産する有機酸を特定するため、植物が無菌栽培実験において生産する有機酸の分析を行った。モデル植物としてホワイトクローバーを用い、その生育には第6章で示した組成の Hoagland 培地を用いた。園芸用のホワイトクローバーの種子を実験に用いた。種子の表面を次のように滅菌した。種子を70%エタノールに1分間浸け、その後7.5%過酸化水素水に4分間浸けた。その後、再度70%エタノールに1分間浸け、最後に滅菌水で洗浄した。表面滅菌した種子を滅菌済みスポンジの上に乗せ、10倍に希釈した Hoagland 培地を20 mL 加え、無菌的に発芽させた。発芽後は、根の部分だけが浸るように10倍に希釈した Hoagland 培地を200 mL 加え、約2ヶ月間栽培した。培地には1週間ごとに Hoagland 培地を2 mL 添加した。

Hoagland 培地中の有機酸分析は、Yamaji らの方法[2]を一部改良し用いた。培養液から有機酸を回収するため、H⁺型に調整した強酸型陽イオン交換樹脂(ダイヤイオン SK1B、三菱ケミカル株式会社)を詰めたカラムに培養液を通液し、金属陽イオンを液相から除去した。通液後の液相をロータリーエバポレーターで濃縮し、5 mL の超純水で回収した。その後、ギ酸水溶液を用いてギ酸型にした陰イオン交換性樹脂(TOYOPACK DEAE M、東ソー株式会社)に濃縮液500 μ L 中の有機酸を保持させた。超純水で樹脂を洗浄した後に、6M ギ酸水溶液を5 mL 通液させ、有機酸を通液に回収した。さらに液相をロータリーエバポレーターで濃縮し、10 mL の超純水で有機酸を回収した。回収した有機酸試料は凍結乾燥させ

保存した。凍結乾燥試料を 100 μ L のピリジンに溶解し、N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide を 100 μ L 加え、37°C で 30 分間加熱した。その後、GC-MS (QP-2010 Ultra、株式会社島津製作所) で分析した。

8.2.2. 粘土鉱物の調整

粘土鉱物は、第 3 章で調整した黒雲母を使用した。この黒雲母試料は 1M 酢酸アンモニウム水溶液で洗浄しており、黒雲母に吸着しているセシウム量は 128 μ g-Cs/g-clay である。

8.2.3. 有機酸添加培地での培養試験

ホワイトクローバーの栽培試験で検出された有機酸は乳酸である(8.3.1. 参照)。そこで、シデロホア生産能力を有する *Pseudomonas* 属の生育に乳酸が及ぼす影響を調べるために、乳酸を添加した培地を用いた培養試験を行った。*Pseudomonas* 属の微生物 (TC4-8) を、PY 液体培地 (10 g/L ペプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L NaCl、0.5g/L MgSO₄·7H₂O) を用いて、25°C で 3-4 日間振とう培養した。遠心分離で細胞を回収し、あらかじめ滅菌したリン酸緩衝生理食塩水を 30 mL 加え、細胞を 2 回洗浄した。細胞にリン酸緩衝生理食塩水を 20 mL 加え、微生物ストック液とした。培養試験は、二種類の培地を用いて行った。オートクレーブ滅菌した M9 培地 (7.3 g/L K₂HPO₄、3.0 g/L KH₂PO₄、6.6 g/L NH₄Cl、3.3 g/L NaCl、pH = 7.0) に、炭素源としてろ過滅菌した乳酸もしくはグルコース水溶液を 1 g/L となるように添加した。この液体培地中での微生物の増殖を確認するため、まず液体培地 100 mL に微生物ストック液を 1 mL 加え、振とう培養した。培養温度はシデロホア生産性の良い温度である 25°C とした[1]。13 時間、18 時間、100 時間後に微生物量の測定を行った。微生物量の測定は、培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定することで行った。100 時間後の培養液については、シデロホアを含む画分の濃縮を行い[1]、濃縮液の吸光スペクトルを測定した。

8.2.4. セシウムを吸着させた粘土鉱物を加えた培養試験

乳酸を添加した培地における微生物の活動が、セシウムを吸着させた粘土鉱物に対してどのような影響を与えるのかを把握するため、セシウム吸着させた黒雲母と共に培養試験を行った。乾熱滅菌した 200 mL 三角フラスコに黒雲母 50 mg と乳酸もしくはグルコース水溶液を加えた M9 培地を 100 mL 加え、最後に微生物ストック液を 1 mL 加えた。また、ブランク実験として、微生物ストック液のかわりに液体培地を 1 mL 加えた。これを 25°C で振とう培養した。培養開始から 4 時間、1 日、5 日、7 日後に培養液 (細胞懸濁液) のサンプリングを行った。サンプリングでは、培養液を 10 mL 分取し、遠心分離した (10000 rpm、10 min)。上澄み液を回収し 0.2 μ m シリンジフィルターでろ過した。回収した固相に新鮮な培地を 10 mL 加え、再懸濁させたのち、三角フラスコ中の元の懸濁液に合わせた。回収した液相中の鉄、アルミニウム、マグネシウム濃度を ICP-OES で測定した。7 日後に

分取した液相については、ICP-MS でセシウム濃度も測定した。

8.3. 結果と考察

8.3.1. 植物の生産する有機酸

培養後の液体培地の GC-MS 分析の全イオンクロマトグラムおよびマススペクトルを図 8-1 に示す。栽培試験後の Hoagland 培地で検出されたピークのうち、栽培試験前の Hoagland 培地（ブランク試料）には見られなかったピークは 6 つあった。これらのピークのライブラリ検索の結果、未知物質（トリメチルシリル（TMS）誘導体）、乳酸 2 TMS 誘導体、硫酸 2 TMS 誘導体、トリプロピレングリコールモノメチルエーテル TMS 誘導体、グリセロール 3 TMS 誘導体の 5 つが確認された。このうち有機酸は乳酸のみである。以上より、ホワイトクローバーが生産する有機酸は乳酸である。

8.3.2. 培養試験

M9 培地に乳酸を加えた培地（M9L）および M9 培地にグルコースを加えた培地（M9G）を用いた培養試験における微生物の増殖に関して、濁度の変化を図 8-2 に示す。どちらの培地においても、微生物細胞が概ね同様に増殖した。M9L 培地中に生産されたシデロホアの生産に関して、シデロホアを含む画分の吸光スペクトルを図 8-3 に示す。図 8-3 から精製した画分には、400 nm 付近に極大吸収があることがわかった。*Pseudomonas* 属が生産するシデロホアが 400 nm 近傍に極大吸収を持つことが知られていることから[3]、M9L 培地中にシデロホアが生産されていたことがわかる。

培養実験における培養液中の鉄、アルミニウム、マグネシウム濃度の変化を図 8-4 に示す。微生物を加えないブランク実験においても、培地中に鉄、アルミニウム、マグネシウムが検出された。この結果は、培地の成分が黒雲母を溶解したことを示している。

微生物を加えた培養液中のアルミニウム（図 8-4 (a)）と鉄（図 8-4 (b)）の濃度は、培養開始から 4 時間後にブランク実験の濃度よりも高くなった。アルミニウムは生体にほとんど含まれない元素であるので、この結果は微生物により黒雲母の溶解が増加したことを示している。培養開始 4 時間後の元素濃度が最も高く、その後は減少を続けた。マグネシウム（図 8-4 (c)）では、微生物培養試験開始後 1 日以後は、ブランク実験の濃度よりも低かった。培養開始 7 日後における液相中のセシウム溶出率を表 8-1 に示す。この溶出率は、M9L 培を加える前の黒雲母中セシウム量と培養 7 日目の液相中セシウム濃度から求めた。M9L 培地では、微生物を加えた実験のセシウム溶出率がブランク実験での溶出率よりも有意に低く（ p 値 < 0.05 ）、M9G 培地では微生物の存在による違いは確認されなかった。

a)

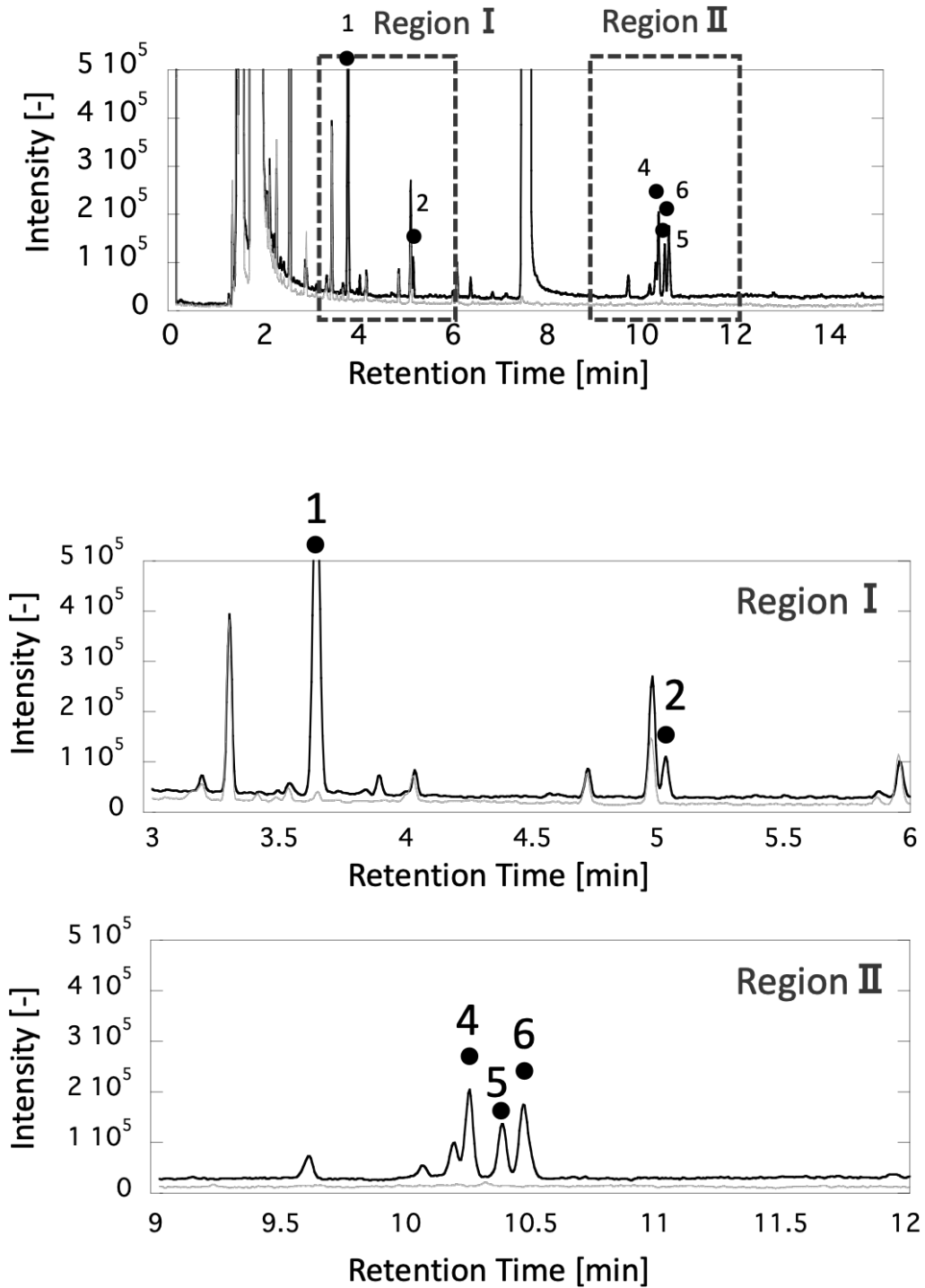


図 8-1 a) 栽培試験後の液体培地の GC-MS のイオンクロマトグラム。●で示したピークが栽培試験前の液体培地（ブランク試料）では検出されず、栽培試験後の液体培地においてのみ出現したピークである。

b)

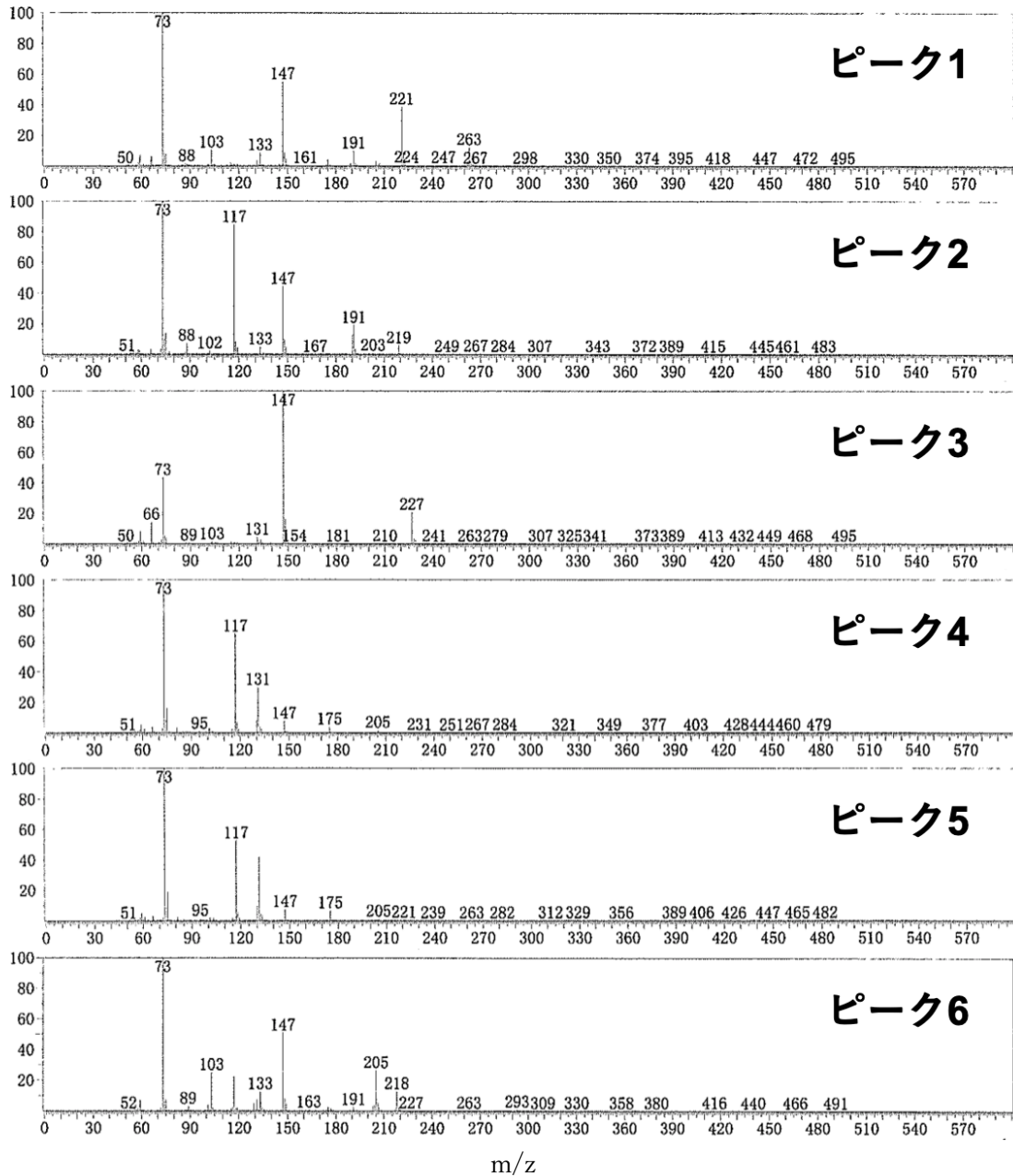


図 8-1 (続き) **b)** 各ピークのマッスペクトル (1: 不明 (TMS 誘導体)、2: 乳酸 2 TMS 誘導体、3: 硫酸 2 TMS 誘導体、4: トリプロピレングリコールモノメチルエーテル TMS 誘導体、5: トリプロピレングリコールモノメチルエーテル TMS 誘導体、6: グリセロール 3 TMS 誘導体)。

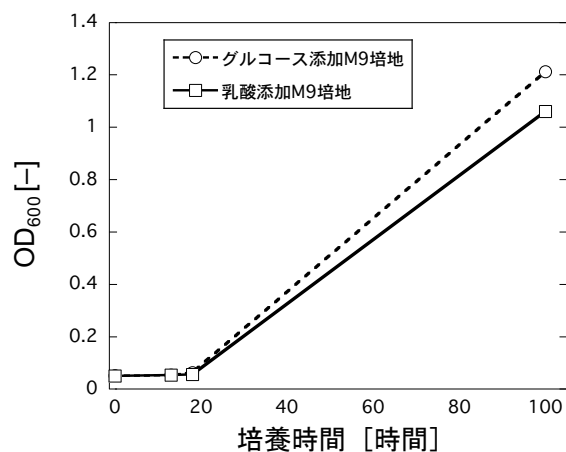


図 8-2 M9L および M9G による微生物の増殖

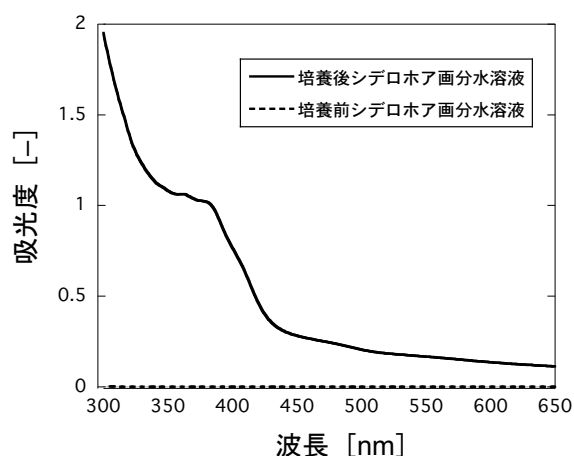


図 8-3 シデロホアを含む画分の吸光スペクトル

このように黒雲母から溶出した鉄、アルミニウム、マグネシウムの濃度は、いずれも微生物培養開始 4 時間後ではブランク実験よりも明らかに高く、4 時間以後に大きく低下した (図 8-4)。セシウムについては M9L 培地における培養開始 7 日後の値のみであるが、微生物培養下ではブランク実験よりも濃度が低下した。図 8-4 に示すように、培養開始後 1 日までは微生物はほとんど増えていなかった。微生物の増殖が起こるのは培養開始から 1 日を経過して以降であり、その間は増殖の準備期間 (誘導期) である。この期間にまず液相中の鉄、アルミニウム、マグネシウム濃度が大きく増加しその後低下した (図 8-4)。このことから、誘導期の微生物が黒雲母を溶解したことによって 4 時間時点での元素濃度が増加し、次に溶解したそれらの元素が誘導期の微生物細胞に吸収されたことが、液相中元素濃度変化の原因と考えている。

表 8-1 黒雲母からのセシウム溶出率

サンプル	溶出率 (%)	p 値
M9L	9.4±0.9	<0.05
M9L (Blank)	11.5±1.1	
M9G	9.1±2.2	0.32
M9G (Blank)	9.9±0.4	

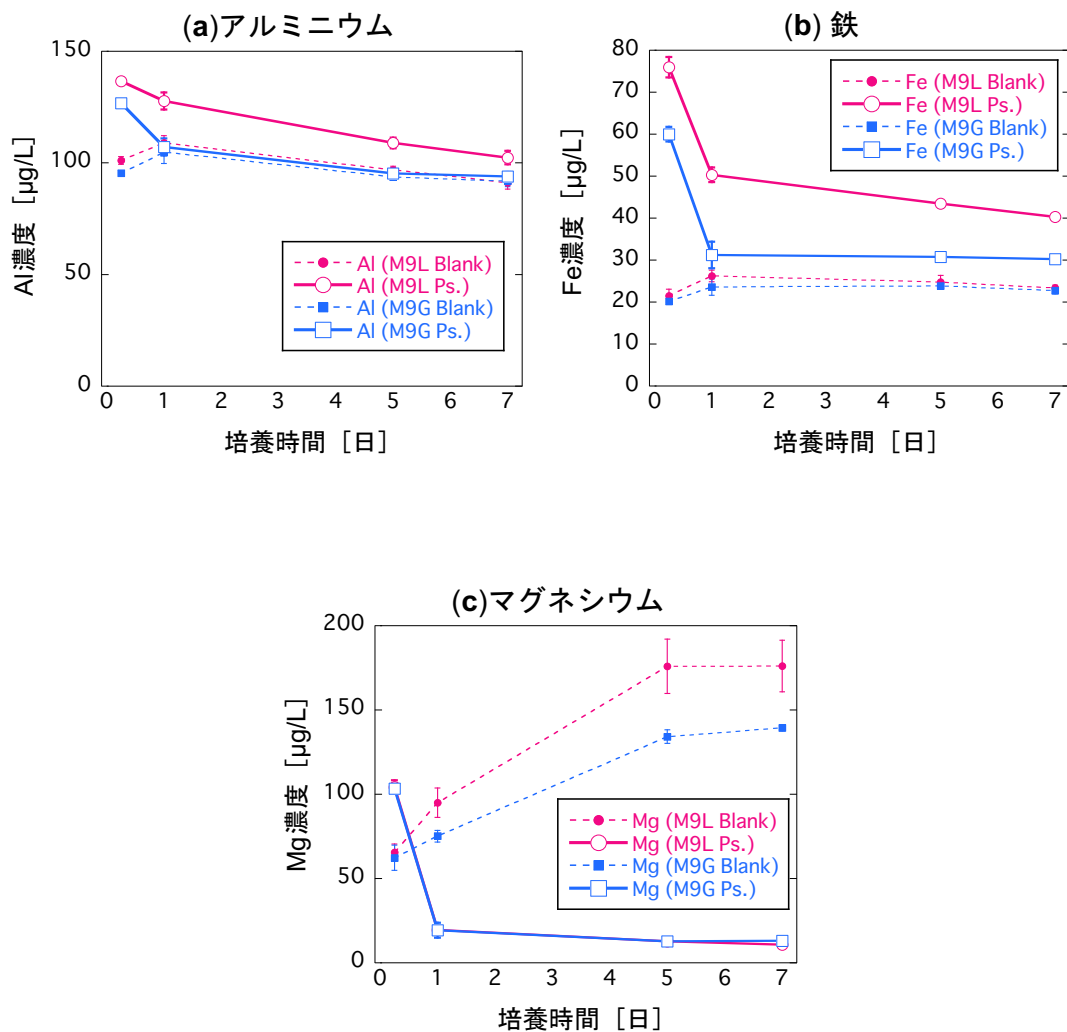


図 8-4 黒雲母を含む培地での培養実験における液相中金属元素濃度の変化 ((a) アルミニウム、(b) 鉄、(c) マグネシウム)

培養開始1日以後に微生物の増殖が始まってからは、必須元素ではないアルミニウム濃度の低下が、生体必須元素である鉄とマグネシウム濃度の低下より明らかに大きかった。つまり、微生物細胞による吸収ではない理由により減少したと考えることができる。微生物の増殖が進むと、フラスコの底に、黒雲母と増殖した微生物細胞を包み込むように大きな有機質膜（バイオフィルム）が形成した。アルミニウムの減少は、このバイオフィルムへの吸着に起因すると考えられる。

微生物を加えた培養実験で、培養開始4時間後におけるアルミニウム（図8-4(a)）と鉄（図8-4(b)）の濃度について、乳酸を添加したM9L培地中濃度の方が、グルコースを添加したM9G培地中濃度よりも高かった。この違いを生じた原因は2つ考えられる。一つは有機酸である。ブランク実験で溶出した鉄、アルミニウム、マグネシウムはいずれも有機酸を添加した系の方がグルコースを添加した系よりも高い。もう一つはシデロホアの生産量の違いである。シデロホアは3価金属と特異的に結合し水溶性錯体を形成する。生産されたシデロホア濃度がM9L培地中濃度の方が高かった可能性が示唆される。つまり、シロツメクサの根に共生する微生物に、シロツメクサが生産する乳酸が与えられると、その共生微生物のシデロホア生産能が増大し、その結果、乳酸による溶解との相乗効果により微生物による黒雲母の溶解が促進した可能性があることを本実験結果は示している。鉄やアルミニウムは多くの粘土鉱物に骨格元素として含まれる元素であるので、本実験結果は粘土鉱物全般に適用できると考えられる。

培養を開始して7日目におけるセシウム溶出率を表8-1に示す。この溶出率は、培地を加える前の黒雲母中セシウム量と培養7日目の液相中セシウム濃度から求めた。微生物培養の有無に関係無く、培養開始7日後の培養液中には、黒雲母に吸着したセシウムの10%

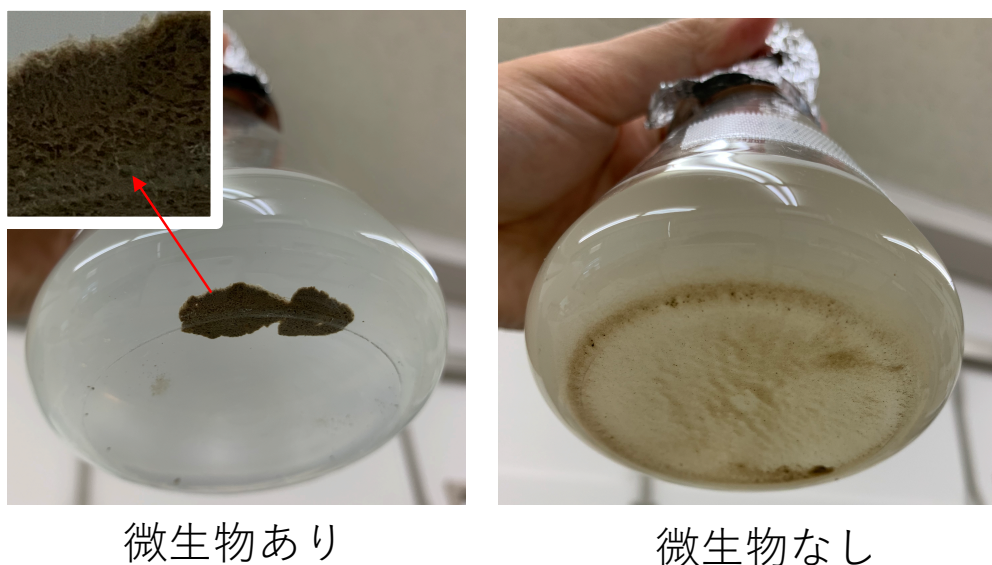


図8-5 培養試験で生成したバイオフィルム

程度が含まれていた（表 8-1）。これらのセシウムは黒雲母の骨格元素である鉄、アルミニウム、マグネシウムの溶出に伴い溶出したと考えられる。粘土鉱物からのアルミニウムや鉄の溶出に伴って、セシウムも溶出することが報告されている[4]。これらの元素の培養開始4時間後における溶出量は、微生物を加えた系の方が微生物を加えないブランク実験よりも明らかに高いことから（図 8-4）、その時点におけるセシウム溶出量も微生物を加えた系の方が高かったと考えられる。それにもかかわらず、7日時点のセシウム濃度は M9G の実験系では同定度、M9L の実験系では減少していた（表 8-4）。黒雲母を加えた培養試験において、微生物はバイオフィルムを形成していた（図 8-5）。バイオフィルムにおいては微生物細胞濃度とシデロホア濃度は周囲よりも高く、微生物の活動が活発である。そのため、溶解したセシウムがバイオフィルム自身やバイオフィルム中の微生物に吸着や吸収されるなどしたため、バイオフィルム外の液相中のセシウム濃度としてはブランク実験でのセシウム濃度よりも低くなった（高くなることがなかった）と推察できる。

8.4. まとめ

本章では、ホワイトクローバーと共生する *Pseudomonas* 属の微生物に対して、ホワイトクローバーが生産する有機酸がどのような影響を与えるのかという点について、セシウムの溶出と粘土鉱物の溶解の観点から実験を行った。その結果、得られた主な知見は以下の通りである。

（1）ホワイトクローバーは有機酸の一種である乳酸を生産することを明らかにした。

（2）乳酸の存在によって *Pseudomonas* 属の微生物による黒雲母の溶解が促進されることが明らかとなった。

（3）黒雲母に吸着した状態のセシウムの一部が培地に溶解した。これは黒雲母の一部が溶解したことにより溶出した結果であると考えられる。培養開始7日後におけるセシウムの溶出率は、微生物の有無にかかわらず同程度であった。セシウムは黒雲母の溶解に伴い溶出したと考えられ、かつ微生物存在下で黒雲母骨格を成す鉄、アルミニウム、マグネシウムの溶解量が高いことを勘案すると、溶解したセシウムの多くは微生物や生成したバイオフィルム中に吸収されたと考えられる。

参考文献

1. Ferreira, M.L., S.A. Ramirez, and D.L. Vullo, *Chemical characterization and ligand behaviour of Pseudomonas veronii 2E siderophores*. World J Microbiol Biotechnol, 2018. **34**(9): p. 134.
2. Yamaji, K., et al., *Root endophytic bacteria of a (137)Cs and Mn accumulator plant, Eleutherococcus sciadophylloides, increase (137)Cs and Mn desorption in the soil*. J Environ Radioact, 2016. **153**: p. 112-119.
3. Albrecht-Gary, A.-M., et al., *Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of Pseudomonas aeruginosa*. Inorganic Chemistry, 1994. **33**(26): p. 6391-6402.
4. Kim, S.M., et al., *Cs desorption behavior during hydrothermal treatment of illite with oxalic acid*. Environ Sci Pollut Res Int, 2020. **27**(28): p. 35580-35590.

第9章 結論

9.1. 本研究で得られた結論

本研究は、福島原発事故によって環境放出された放射性物質のうち、特に放射性セシウムに関して、環境低負荷の汚染物質除去法であるファイトレメディエーションによる放射性セシウムの除染や、より正確な放射性セシウムの環境動態の評価のための基礎的知見の獲得を目的として、一部でしか報告のないシデロホアの存在による粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出現象の詳細を明らかにすることを試みたものである。

まず第2章にて、自生するホワイトクローバー根中から単離した微生物に、シデロホア生産能力を有した微生物が存在していることを明らかにした。また、これらのうちの一部は、特にシデロホア生産能力が高いものも存在していた。この微生物の生産するシデロホアは、粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出量を増加させた。また、セシウムの溶出は1時間程度の非常に短時間で起こることを見出した。

第3章においては、粘土鉱物におけるセシウムの吸着挙動において考慮すべき点である粘土鉱物の種類、風化作用が、シデロホアによるセシウム溶出量の増加効果に与える影響に関して評価を行った。粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出挙動に関しては、化学形態の分類に基づいた逐次抽出法など、様々な溶出液を用いて検討されているが、シデロホアを用いて行われたものはほとんどない。本研究では黒雲母やイライト、バーミキュライトといった土壤中でセシウムを固定していると考えられている鉱物のほか、似た構造を有する代表的な粘土鉱物（モンモリロナイトやカオリナイト、ディッカイト、パイロフィライト）におけるセシウムの溶出挙動を調べた。さらに、環境中における放射性セシウムの吸着状態に影響を与える風化作用に関しても、粘土鉱物試料に人工的に風化効果を与えることで、その影響を調べた。その結果、セシウムを非常に強く固定する黒雲母、イライト、風化黒雲母に対して、シデロホアによるセシウム溶出量の増加の効果が高いことを示した。

第4章では、吸着したセシウム濃度の違いが、シデロホアによるセシウム溶出量の増加効果に与える影響に関して評価を行った。環境中における放射性セシウムの濃度は極めて低濃度であり、この濃度は粘土鉱物へのセシウムの吸着挙動に大きく影響する。安定同位体セシウムと放射性セシウムをそれぞれ吸着させた粘土鉱物を用いたシデロホアによる振とう試験を行った。その結果、福島県において観察される放射性セシウムと同程度の濃度においても、シデロホアの存在によりセシウム溶出量が増加することが示された。

第5章では、シデロホアによるセシウム溶出量の増加効果に関するメカニズムの考察を実験的に行った。セシウムを強く固定している粘土鉱物は、構造的な作用が働き、他のカチオンよりも強く固定していると考えられる。そのため、構造の変化が生じれば、セシウムの吸着特性に大きな変化が起こることが期待されるが、電子顕微鏡などによる直接的な観察は不可能である。そこで、粘土鉱物を構成する主要元素であるケイ素、アルミニウム、鉄に着

目し、これらの元素の溶出特性と合わせて検討した。加えて、セシウムとの競合カチオンであるアンモニウムイオンを添加した系における元素の溶出挙動も測定した。その結果、シデロホアの作用による粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出が促進される現象について、以下のメカニズムの推定ができた。(1)まず黒雲母のエッジ部分に存在する鉄やアルミニウムなどの元素がシデロホアとキレート形成し、脱離する。(2)これらの元素が欠陥したことに付随して、シデロホアとはキレートをなさない元素も溶出してゆく。(3)その結果、エッジ部に吸着しているセシウムが脱離してゆく。

第6章は土壌中のシデロホア生産微生物と、土壌で栽培した植物の根に共生した微生物の比較を通じて、土壌中におけるシデロホア生産微生物と植物との共生関係に関する検討を行った。土壌試料からシデロホア生産微生物として、*Pseudomonas* 属と *Bacillus* 属を分離した。滅菌したホワイトクローバーの種子を栽培し、栽培根中に生息しているシデロホア生産微生物として、*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Burkholderia* 属、*Azospirillum* 属、*Duganella* 属を分離した。土壌試料および栽培根において確認された *Pseudomonas* 属と *Bacillus* 属は、根域土壌および根中でシデロホアを生産する可能性を指摘した。また、土壌と栽培根における微生物種の違いは、相対的な出現頻度の違いおよび生息環境によるシデロホア生産特性の違いが原因と推察された。

第7章では、微生物活動と粘土鉱物との関係において、粘土鉱物から溶出した元素の微生物への取着、および微生物によるシデロホアを生産と粘土鉱物構成元素の溶出挙動との関係性について実験的に観察にした。その結果、シデロホア生産微生物の活動により、粘土鉱物の構成元素の溶出が起こり、溶出した元素の一部は微生物が吸収利用した可能性を指摘した。これらの元素の溶出挙動は、微生物や粘土鉱物によって異なっていた。また、液相中にはシデロホアが存在し、それらは鉄と結合していた。つまり、シデロホア生産微生物はシデロホアを生産し、粘土鉱物から鉄を溶出させていることを実験的に示した。

第8章では、ホワイトクローバーと共生する *Pseudomonas* 属の微生物に対して、ホワイトクローバーが生産する有機酸がどのような影響を与えるのかという点について、セシウムの溶出と粘土鉱物の溶解の観点から実験を行った。その結果、ホワイトクローバーは有機酸の一種である乳酸を生産することを明らかにし、乳酸の存在によって *Pseudomonas* 属の微生物による黒雲母の溶解が促進されることが明らかとなった。黒雲母に吸着した状態のセシウムの一部が培地に溶解した。これは黒雲母の一部が溶解したことにより溶出した結果であると考えられる。培養開始7日後におけるセシウムの溶出率は、微生物の有無にかかわらず同程度であった。セシウムは黒雲母の溶解に伴い溶出したと考えられ、かつ微生物存在下で黒雲母骨格を成す鉄、アルミニウム、マグネシウムの溶解量が高いことを勘案すると、溶解したセシウムの多くは微生物や生成したバイオフィーム中に吸収されたと考えられる。

9.2. 今後の展望

本研究は、シデロホアによる粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出現象に関して、シデロホア-粘土鉱物間とシデロホア生産微生物-粘土鉱物間の二つの視点をから、土壤中の放射性セシウムのファイトレメディエーション法や環境動態評価に関する基礎的知見の獲得を行った。

微生物の生産したシデロホアと粘土鉱物に関する実験的考察から、粘土鉱物の種類やセシウムの濃度がシデロホアによる粘土鉱物に吸着したセシウムの溶出現象に与える影響を明らかにし、そのメカニズムの推察を行った。これらの知見は、土壤中に含まれる多種多様な粘土鉱物や風化作用によるそれらの変質効果を加味した、放射性セシウムの環境動態評価につながると考えられる。また、福島県においては、黒雲母やバーミキュライトが豊富な土壌であるため、本研究における実験は、黒雲母に関する実験が中心になっている。本研究で実施した実験的手法によるセシウム溶出現象の評価は、現地に即した粘土鉱物に置き換えることで、より適切な評価に繋がることが期待できる。

シデロホア生産微生物の活動が、土壌中での粘土鉱物の溶解と、それに付随するセシウムの溶出に与える影響に関して、特に、植物根における植物とシデロホア生産微生物との共生関係、シデロホア生産微生物の活動と粘土鉱物の溶解現象、植物の生産する有機酸による影響に着目して検討を行った。本研究では、粘土鉱物から脱離したセシウムの挙動に関して明らかにすることはできなかった。放射性セシウムのファイトレメディエーション法の開発や環境動態評価へと応用するためには、微生物やバイオフィルムへの、脱離したセシウムの収着挙動の把握に加え、それらを通じた植物体への移行を検討することが必要である。また、実際の土壌環境は非常に複雑であり、シデロホア生産微生物の活動や粘土鉱物の溶解、それに付随するセシウムの溶出に影響を与える他の要因の検討も必要であると考えられる。

放射性セシウムは、環境放出されたもののみならず、原子力発電所の運転に伴って発生する高濃度の放射性廃棄物の処分場においても管理の必要性がある。本研究で得られた、微生物の生産するシデロホアが粘土鉱物に影響を与え、セシウムの溶出挙動を変化させるという成果は、長期間にわたる高濃度放射性物質の管理の観点においても、新たな知見を提供し、より安全な管理のための基礎的知見として活用されることとも期待している。

謝辞

本論文を提出するにあたり、多くの方々のご指導とご助力をいただきました。

主査を引き受けていただきました京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻教授 米田稔先生に厚く御礼申し上げます。至らぬところの多い私を、指導教員として受け入れていただき、本研究の実施に際し、研究指導委託や協力講座先での実験なども含め、多くの機会を与えていただいたことに、感謝申し上げます。

本論文を提出するにあたり、2名の先生に副査をお願いし、ご助言を賜りました。京都大学複合原子力科学研究所原子力基礎工学研究部門准教授 福谷哲先生には、学部4回生の配属時より、終始あたたかいご指導と叱咤激励を承りました。自らの興味に基づいて自由に研究活動できる環境を与えていただき、研究の立案段階から本論文の提出まで、何物にも代え難い大変貴重な機会をいただきました。心より御礼申し上げます。

京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻教授 清水芳久先生には、とてもクリティカルで有益なご指摘のほか、本研究の応用可能性についても明確にご指摘くださったことに、厚く御礼申し上げます。

本論文の提出にあたり、京都大学複合原子力科学研究所原子力基礎工学研究部門助教 池上麻衣子先生には、実験補助や様々なご指導を賜りましたことに感謝いたします。

日本原子力研究開発機構界面反応場化学研究グループの香西直文マネージャーには、実験にかかる多くのご指摘のほか、論文執筆や学会発表などの機会を与えてくださったことに、心から御礼申し上げます。同グループの Bernd Grambow グループリーダーには、ディスカッションにおいて、多くの有益なご指摘をいただいたことに感謝いたします。また、同グループの坂本文徳研究主幹には、実験手法の指導のほか、日本原子力研究開発機構の滞在における様々な支援まで、多くのことをしていただいたことに、大変感謝いたします。

また、日本原子力研究開発機構での滞在においては、拙い英語しかできない私に常に耳を傾けていただき、また共同で実験もさせていただいた Guido-Garcia Fabiola 博士研究員、実験手法等に多くをご助言いただきました上田祐生研究員をはじめ、界面反応場化学研究グループの皆様（田中万也研究副主幹、青柳登研究副主幹、下山巖研究主幹、南川卓也研究員、杉田剛研究員、徳永紘平研究員、春間俊克博士研究員、江口綾乃さん、菊池圭くん）にも大変お世話になりました。感謝申し上げます。

微生物に関する実験指導をいただいた筑波大学生命環境系准教授の山路恵子先生には厚く御礼申し上げます。また、筑波大学での実験補助をはじめ、突然訪れたにも関わらず大変よくしていただきました山路研の皆様にも、大変感謝いたします。

本研究は、上記の方々をはじめとする皆様からの多くのご助力を賜りましたおかげで、学位論文としてまとまったものです。お世話になりましたの方々に対して、深く感謝いたします。最後に、長きにわたり、博士後期課程への進学への理解と、心身ともにいつも支えていただいた家族に、心から感謝いたします。