

## 銅汚染土壌のファイトレメディエーションにおけるEDTAの添加効果

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	井上, 博道 佐伯, 和利 筑紫, 二郎
巻/号	74巻2号
掲載ページ	p. 169-174
発行年月	2003年4月

# 銅汚染土壌のファイトレメディエーションにおける EDTA の添加効果\*

井上博道\*\*・佐伯和利\*\*・筑紫二郎\*\*

キーワード カラシナ, 銅汚染土壌, EDTA, ファイトレメディエーション, トウモロコシ

## 1. はじめに

昔から、人類は様々な用途に種々の重金属を使用つまり消費してきた。その消費されたものは、最終的には廃棄物として環境中に放出されることになる。どのような処理を施しても、重金属は、本質的には消滅せず、終末的に土壌環境に入ることになる。それらの廃棄物の適切な処理がなされなければ、今後ますます重金属汚染土壌の面積が拡大するものと考えられる。重金属のうち、銅は植物にとって必須元素であるが、過剰障害も出やすい元素の1つである<sup>8)</sup>。鉱山跡地周辺でみられる農作物被害の多くは銅による場合が多いといわれている<sup>8)</sup>。日本では全国各地に150カ所もの金属鉱山があり<sup>9)</sup>、その約半数が銅を含む鉱石を産出している。これらの鉱山は山間部に位置することが多く<sup>14)</sup>、足尾銅山を上流にもつ渡良瀬川流域のように、水系を介して銅汚染が下流の水田に拡大するような事例が多い。

重金属汚染土壌の修復には、多大の労力、費用および時間が必要である。ファイトレメディエーション (Phytoremediation, 植物による修復) は、従来の作物栽培技術を用いて土壌の修復を行うもので、排土-客土による工学的な修復に比べ、対象面積が広い場合、労力と費用面において優れていると試算されている<sup>4)</sup>。ファイトレメディエーションが適する土壌の条件としては、その土壌中重金属濃度が比較的低いことと、植物の栽培が可能であることが挙げられる。植物の性質では、多量の金属を速やかに土壌から吸収し、その地上部に移行させることがファイトレメディエーションに適する条件となる。そのため、重金属を高濃度に集積しかつ生育が早く、バイオマスが大きくなる植物が望まれる。

水耕栽培では、カラシナ (*Brassica juncea* Coss.) の亜鉛蓄積能力が高く、地上部の亜鉛濃度が約  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  であったことが報告されている<sup>3)</sup>。その時の地上部バイオマスは、2週間の栽培で1個体当たりの乾物重で約0.5gと低い値であった。また、カラシナは、4つのアブラナ科植

物の中で、カドミウムの根から地上部への移動速度が高いことがわかっている<sup>12)</sup>。ただし、ダイコンに比べ、バイオマス生産量が大幅に低いことも報告されている<sup>12)</sup>。そのため、カラシナの地上部のバイオマス生産量は一般的な作物に比べ大きいとはいえず、数年で重金属汚染土壌を修復することを考えると、現在のカラシナより金属集積量を高めるか、もしくはよりバイオマス生産量を増加させる必要がある。

地上部の重金属集積量を増加させる方法としては、キレート剤などの薬剤の添加が検討されている。例えば、Huangら<sup>7)</sup>はエチレンジアミン4酢酸 (EDTA) の添加によって、土壌中の鉛の可給態画分が増加し、エンドウ (*Pisum sativum* L.) の鉛吸収量が増加したことを報告している。Blaylock and James<sup>2)</sup>は、アスコルビン酸などの有機酸の添加でムギ類のセレン吸収が高まったことを報告している。

銅を扱った研究例は、養液栽培では存在するが、土耕栽培ではほとんど見当たらない。そこで、本研究では重金属蓄積能力が高いカラシナと高バイオマスであるトウモロコシ (*Zea mays* L.) を銅添加土壌に栽培し、添加剤を用いて、土壌からの銅の効率的な除去について検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試土壌

供試土壌は、熊本県西合志町の九州沖縄農業研究センター内のトウモロコシ栽培圃場から採取したアロフェン質黒ボク土 (以後、黒ボク土) と福岡県内の市販の建築材料用である花崗岩風化土 (陸成未熟土, 以後、マサ土) に、試薬の無水硫酸銅を添加することにより作成した。硫酸銅を添加した土壌は圃場容水量の50%まで蒸留水を加え、室温で1週間静置した後、栽培に用いた。土壌のpH (H<sub>2</sub>O) はガラス電極法、有機物含量は強熱減量法<sup>11)</sup>、陽イオン交換容量 (CEC) は Wada and Harada の方法<sup>15)</sup> により分析した。圃場容水量は、ろ紙で底を付けた100 mLの採土円筒に風乾細土を充填し、毛管飽和させることにより最大容水量を測定し<sup>5)</sup>、その60%として求めた。

### 2) 土壌からの銅の抽出

全銅含量は過塩素酸分解法<sup>1)</sup>で行った。各種塩による銅抽出試験では、前出の方法により作成した銅添加土壌を風乾し、試料とした。黒ボク土もしくはマサ土5gに0.1M塩酸あるいは異なる濃度 (0.1, 1, 10, 100 mM) の

\* 本報告の一部は2002年4月の日本土壌肥料学会名古屋大会で発表した。

\*\* 九州大学生物環境調節センター (812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1)

2002年5月17日受付・2002年9月9日受理

日本土壌肥料学雑誌 第74巻 第2号 p.169~174 (2003)

EDTA2Na, クエン酸, または硫酸アンモニウムの各溶液 25 mL を加え, 30°C で 1 時間振とう後, ろ過し, 原子吸光度法 (島津, AA-670) により抽出液中の銅を測定した。

### 3) 栽培方法と供試植物

栽培試験は, 九州大学生物環境調節センター内の人工気象装置 (気温 25°C, 湿度 70%, 自然光) において 2000 年 11 月~2002 年 1 月に行った。供試植物はカラシナ (*Brassica juncea* Coss. cv. Hakarashina) とトウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Pioneer 33G26) を用い, 350 mL 容ポットで 3 週間栽培した。堆肥連用していた圃場から採取した黒ボク土には施肥を行わず, マサ土にのみ 100 kg ha<sup>-1</sup> 相当の窒素, リン酸, カリウムを施肥した。栽培期間中, 圃場容水量 (マサ土, 0.23 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>; 黒ボク土, 0.60 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>) を保つように, 毎日圃場容水量になるまで重量で蒸留水を与えた。栽培後, 地上部を採取し, 乾燥粉碎後, 乾式灰化し原子吸光度法により試料の銅濃度を求めた。

### 4) EDTA 添加試験

EDTA 添加試験は, 0, 0.1, 1, 10, 100 mM の EDTA2Na 溶液を播種 1 週間後にポット当たり 10 mL をシリンジにより土壌表面に添加し, 播種 3 週間後に地上部を採取した。採取した地上部は 3) と同様にして植物体中の銅濃度を求めた。また, 黒ボク土では, 根を土中から分別後蒸留水で洗い, 乾燥後, 地上部と同様にして銅濃度を求めた。

### 5) 統計解析法

各分析は 3 反復で行い, 得られた値は分散分析後, Tukey 法<sup>13)</sup> により平均値の差の検定を行った。

## 3. 結果および考察

### 1) 供試土壌の比較

原土の性質は表 1 に示す。黒ボク土はマサ土に比べ, 有機物含量と CEC が高く, 全銅含量も約 10 倍であったが, 0.1 M 塩酸抽出銅の値はほぼ同じであった。これは, 黒ボク土の構成成分の銅に対する吸着力が強いことを示している。黒ボク土は pH 5.6 で, マサ土 (pH 6.4) より若干酸性であるが, 銅の溶解度および栽培への影響は少ないと判断し, pH の調整は行わなかった。

### 2) 銅添加量の検討

植物栽培試験に供試する土壌への銅添加量を決定するために, 異なる濃度の銅添加マサ土における植物の銅吸収量の比較を行った (図 1)。予備試験から, 100 μg g<sup>-1</sup> の銅を添加したマサ土でカラシナは生育できなかったため, 添加量 (75 μg g<sup>-1</sup>) までの 3 段階で比較を行った。植物の地上部銅濃度は, 銅の添加量の増加と共に増加した。同一添加量では, カラシナはトウモロコシの 3.1~8.6 倍の銅濃度を示した。地上部乾物重は, カラシナでは 50 μg g<sup>-1</sup> の添加量で無添加の 1/10 に減少し, トウモロコシでは 75 μg g<sup>-1</sup> の添加量で無添加の 1/5 に減少した。カラシナとトウモロコシいずれにおいても, それぞれの銅添加量によって大幅に植物地上部の銅濃度が増加していたことから, 銅の過剰障害によって乾物重が減少したものと考えられる。2 種の植物ともに 25 μg g<sup>-1</sup> 土壌では銅の濃度障害と考えられる地上部の減少はみられなかった。そこで, 以後の試験は, マサ土では 25 μg g<sup>-1</sup> 銅添加土壌で行った。

予備試験で, 黒ボク土に 500 μg g<sup>-1</sup> の銅を添加した場合, 植物の生育状態は無添加とほぼ同じであった。そのため, 銅添加量が同じでも, マサ土と黒ボク土とでは, 植物

表 1 供試土壌の性質

供試土壌	pH(H <sub>2</sub> O)	有機物 %	CEC cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	圃場容水量 m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup>	全銅含量 μg Cu g <sup>-1</sup>	0.1 M 塩酸抽出銅 μg Cu g <sup>-1</sup>
マサ土	6.4	3.4	0.5	0.23	4.3	0.14
黒ボク土	5.6	23.3	31.2	0.60	42.2	0.15

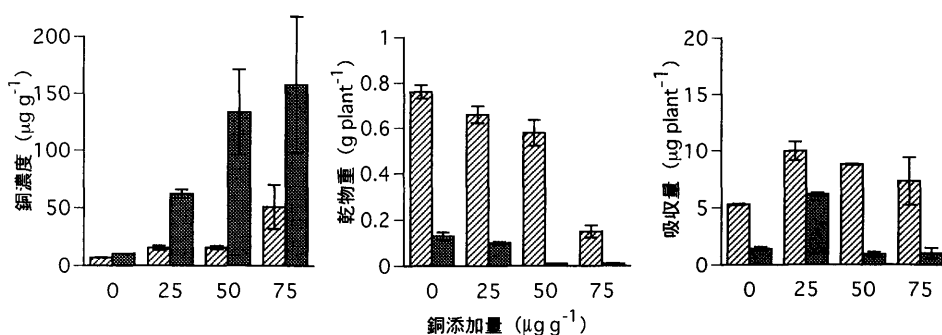


図 1 銅添加マサ土における植物の銅濃度, 乾物重, 銅吸収量  
 ▨ トウモロコシ; ■ カラシナ。

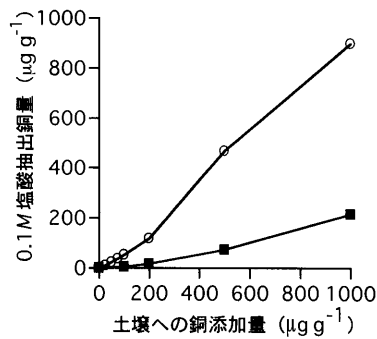


図2 土壌への銅添加量と0.1M塩酸抽出銅量との関係  
○, マサ土; ■, 黒ボク土.

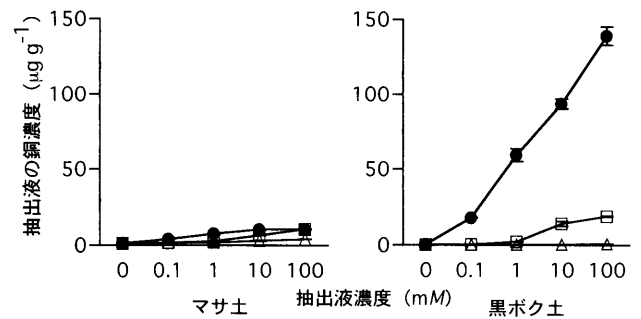


図3 異なる濃度の抽出液による銅抽出量の比較  
●, EDTA; □, クエン酸; △, 硫酸アンモニウム. 土壌の銅添加濃度: マサ土,  $25 \mu\text{g g}^{-1}$ ; 黒ボク土,  $250 \mu\text{g g}^{-1}$ .

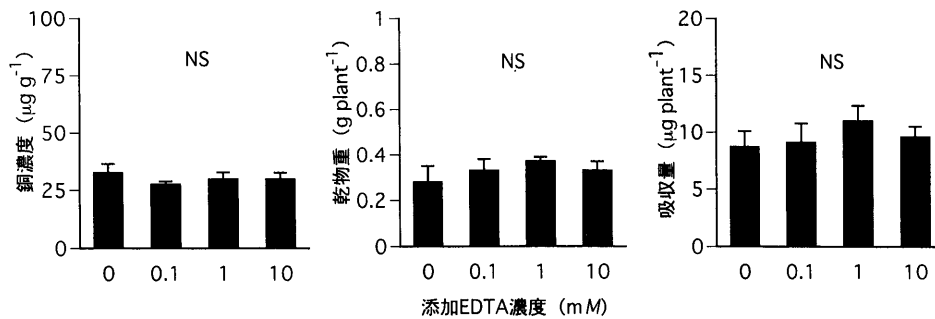


図4 EDTA処理したトウモロコシの銅濃度, 乾物重, 銅吸収量 (マサ土)  
NSは有意な差がないことを示す.

の吸収可能な銅量は大きく異なることが予想される。そこで、可給態銅を同等に設定するため、銅添加量に対する0.1M塩酸による銅抽出量の2つの土壌間の比較を行った(図2)。黒ボク土、マサ土とも銅を添加するほど0.1M塩酸で抽出される銅量は増加したが、黒ボク土ではマサ土に比べ小さな値を示し、1000  $\mu\text{g g}^{-1}$ の銅添加量での0.1M塩酸抽出銅量はマサ土で900  $\mu\text{g g}^{-1}$ に対し、黒ボク土では215  $\mu\text{g g}^{-1}$ であった。黒ボク土はマサ土よりも有機物含量が高く(表1)、有機物や酸化物鉱物に特異吸着した銅が多かったため、0.1M塩酸で抽出された銅量が少なかったものと考えられる。

25  $\mu\text{g g}^{-1}$ 添加マサ土の0.1M塩酸抽出銅量は、250  $\mu\text{g g}^{-1}$ 添加黒ボク土の抽出銅量にほぼ相当したので、黒ボク土では250  $\mu\text{g g}^{-1}$ の添加量で栽培試験を行うことにした。

### 3) 添加剤による抽出能の比較

植物の重金属吸収量を増加させるため、添加剤を使用することが検討されてきた。例えば、EDTAの添加によって、エンドウの鉛吸収量が増加したことが報告されている<sup>7)</sup>。また、クエン酸の添加によって、カラシナのウラン濃度が増加したこと<sup>9)</sup>、硫酸アンモニウムによってカラシナやトウモロコシなどのセシウム<sup>137</sup>濃度が増加したこと<sup>10)</sup>が報告されている。

まず、異なる濃度の3種の添加剤(EDTA, クエン酸, 硫酸アンモニウム)の銅添加土壌からの銅抽出量を比較した(図3)。マサ土では、0.1mMから10mMの濃度では

EDTAの抽出能が高かったが、100mMではEDTAとクエン酸の抽出液の銅濃度が同じであった。マサ土では抽出液濃度を100mMに高めても10mM抽出液中の銅濃度と変わらず、EDTAで抽出可能画分の銅が10mMの濃度で大部分が抽出されたものと考えられる。黒ボク土の場合、EDTAの銅抽出能が高く、100mMではクエン酸の7.4倍、硫酸アンモニウムの183倍の銅が抽出された。よって、植物の銅吸収量を高める添加剤としては、EDTAが優れていることが確認された。

### 4) 銅吸収量に対するEDTA添加の効果

植物栽培中、土壌にEDTAを添加し、植物による銅吸収に対する効果について検討した。マサ土の場合、EDTAを添加してもトウモロコシの地上部の銅吸収量に違いはなかった(図4)。なお、マサ土で栽培したトウモロコシには、100mMのEDTA溶液添加区を設けなかった。その理由は、植物地上部に100mMのEDTA溶液が接触した個体で塩類濃度障害と考えられる枯死がみられたためである。そのため、カラシナおよび黒ボク土の試験では、EDTA溶液が植物体にかからないように注意して土壌に添加した。マサ土のトウモロコシ栽培試験に100mM EDTA添加区を設定した場合、銅吸収に対するEDTAの効果が見られることも予想される。しかしながら、図3においてマサ土に10mMおよび100mM溶液で抽出される銅の量はほぼ同じであったため、マサ土で栽培したトウモロコシによって吸収可能な銅量に関しても10mM区と

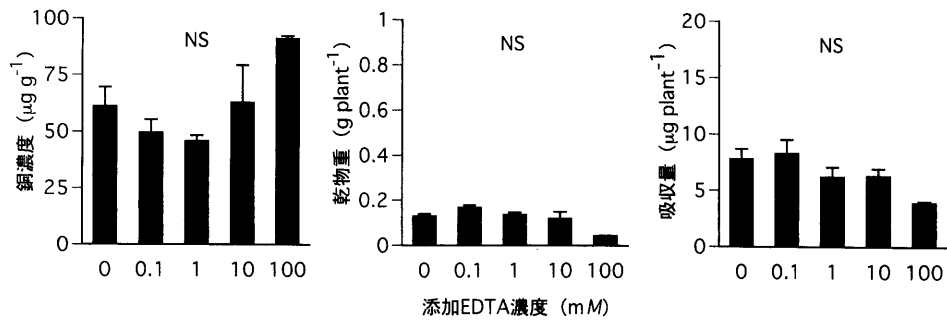


図5 EDTA 処理したカラシナの銅濃度，乾物重，銅吸収量（マサ土）  
NSは有意な差がないことを示す。

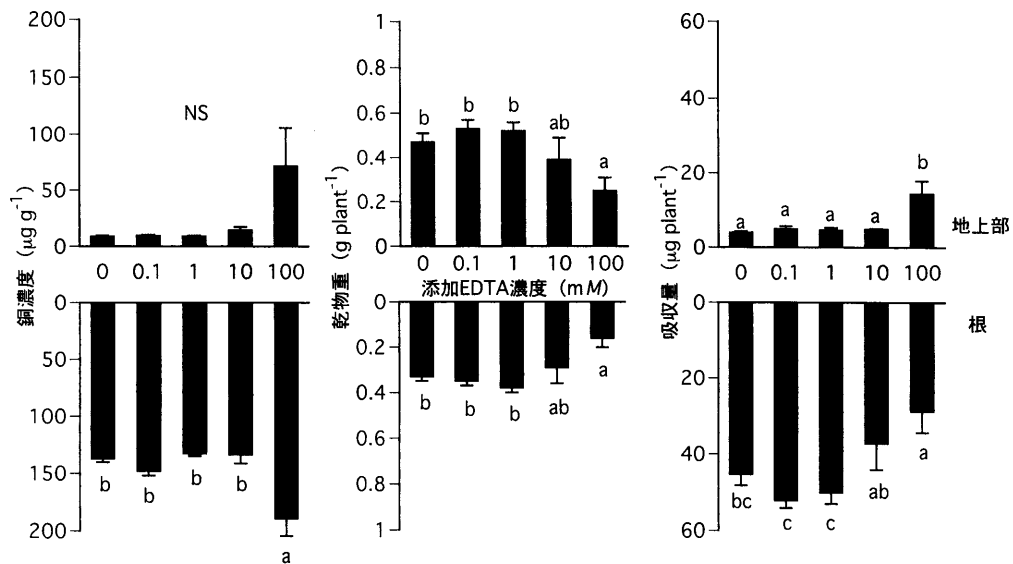


図6 EDTA 処理したトウモロコシの銅濃度，乾物重，銅吸収量（黒ボク土）  
NSは有意な差がないことを，異なる記号は5%水準で有意な差があることを示す。

100 mM 区で大きな違いはないと予想でき、100 mM EDTA 溶液の添加によってマサ土で栽培したトウモロコシの銅吸収量が有意に増加することはないであろうと考えている。一方、カラシナでは100 mM EDTA を添加した場合、無添加に比べ地上部の銅濃度が高まったが（有意差なし）、地上部乾物重が減少し、結果的にカラシナの地上部銅吸収量は低くなる傾向がみられた（図5）。

黒ボク土の場合、100 mM の EDTA 添加によってトウモロコシの地上部銅濃度は無添加に比べ平均値では著しく増加したものの、有意差は認められなかった。しかし、地上部の銅吸収量は無添加の3.7倍であり、1%水準で有意差があった（図6）。一方、カラシナの地上部銅蓄積量に対する EDTA の効果はみられなかった（図7）。

トウモロコシの場合、根で吸収された銅は地上部への移動は制限されており、根で蓄積されるものと考えられる。実際、黒ボク土で栽培したトウモロコシでは、EDTA 無添加で根に約  $45 \mu\text{g plant}^{-1}$  の銅が蓄積されていた。また、100 mM EDTA 添加区では、根での銅の蓄積量は約  $29 \mu\text{g plant}^{-1}$  になった。根に蓄積された銅が、EDTA の

添加によって根で EDTA-Cu の錯体を形成し、地上部への移動が増加したか、もしくは土壤中の銅が EDTA と結合し、根表面で吸着されず、維管束を介して地上部へ移動したため、地上部の銅蓄積量が増加したものと推察される。

カラシナの場合、トウモロコシとは異なり、もともと地上部への銅の移動量が高かったことが考えられる。Quartacci ら<sup>12)</sup> は、カラシナが他のアブラナ科植物に比べ、カドミウムの地上部への移動量が多かったことを報告している。実際、黒ボク土で、カラシナの根での銅蓄積量は地上部の約0.7倍とトウモロコシ（EDTA 無添加で約12倍）に比べ、違いがあった。また、EDTA 無添加区の植物体の地上部/根の銅濃度比では、トウモロコシ、カラシナでそれぞれ0.06、0.23であり、トウモロコシの方が根に蓄積しやすかったと考えられる。100 mM EDTA 添加区では、地上部/根の銅濃度比が、トウモロコシ、カラシナでそれぞれ0.38、0.32と近い値を示した。そのため、EDTA 添加によって、トウモロコシの根から地上部への銅の移動性が高まったと考察できる。EDTA 添加区では、

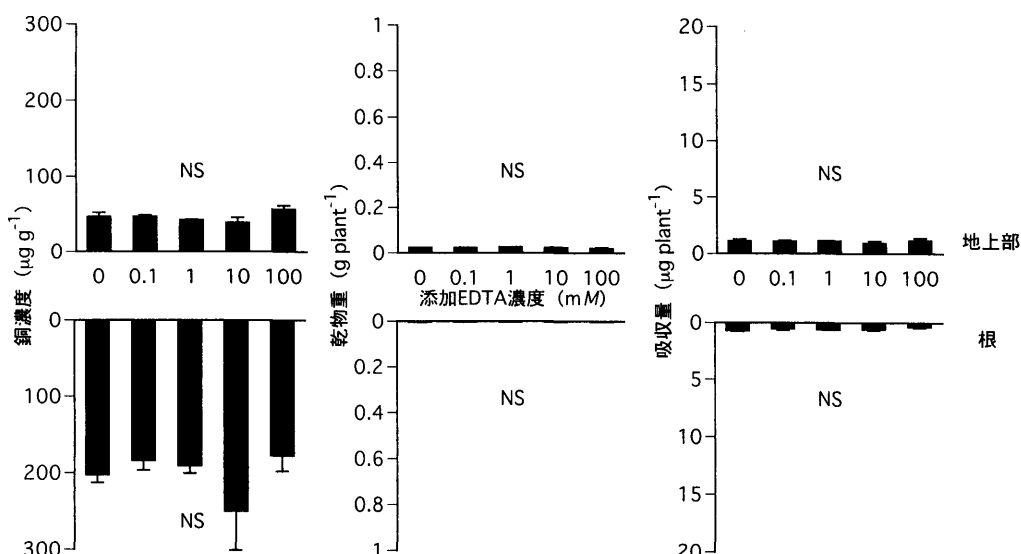


図7 EDTA 処理したカラシナの銅濃度，乾物重，銅吸収量（黒ボク土）  
NS は有意な差がないことを示す。

植物によって吸収された全ての銅の中に占める EDTA-Cu の割合が高く，その EDTA-Cu が地上部へ転流しやすかったものと考えられる。

本試験において，植物地上部の銅蓄積量に対する EDTA 添加効果が，黒ボク土でみられた理由としては，黒ボク土で有機物および酸化物鉱物に吸着した銅が多く存在し，EDTA の添加により吸着していた銅が脱着し，可溶化した銅（EDTA-Cu）を植物が吸収し，地上部へ転流したためと考えられる。ただし，土壤溶液中の可給態銅濃度の増加に伴い，植物に濃度障害が起き，植物の乾物重が減少することによって，植物体全体の銅蓄積量には EDTA の効果が認められなかったことが考えられる。

植物地上部の銅蓄積量に対する EDTA の効果は，今回の試験では，添加濃度の違いだけでなく，植物の違いによっても異なった。今後，複数の土壤条件で植物を栽培することにより，特定の土壤条件で効果のある植物およびキレート剤の添加方法についてはさらに検討する必要がある。近年，重金属汚染土壌へのキレート剤の添加は，可溶化した重金属の溶脱によって地下水などへの二次汚染を引き起こすことが懸念されている。そのため，ファイトレメディエーションにおいてキレート剤を利用する場合には，土壤特性，植物種などを考慮に入れ，効率的に重金属を回収できるように添加する必要がある。

#### 4. 要 約

重金属蓄積能力が高いカラシナと高バイオマスであるトウモロコシを用いて，銅添加土壌からの銅の効率的な除去に対する添加剤の効果を検討した。供試した栽培土壌への銅添加量は，可給態銅量を同じくらいに設定するため，マサ土では  $25 \mu\text{g g}^{-1}$ ，黒ボク土では  $250 \mu\text{g g}^{-1}$  とした。

1) EDTA，クエン酸，硫酸アンモニウムの中で，植

物の銅吸収量を高める添加剤としては，EDTA が優れていることが確認された。

2) 植物栽培中に土壌に EDTA を添加し，植物による地上部銅蓄積量に対する EDTA の効果について検討した。黒ボク土の場合，100 mM の EDTA 添加によって，トウモロコシの地上部銅蓄積量は無添加の 3.7 倍になった。一方，カラシナでは地上部銅蓄積量に対する EDTA の効果はみられなかった。

植物の地上部銅蓄積量に対する EDTA の効果は，本試験においては，添加濃度だけでなく，植物種によっても変動した。

#### 文 献

- 1) Baker, D. E. and Amacher, M. C. : Nickel, copper, zinc, and cadmium ; in *Methods of Soil Analysis, Part 2*, ed. A. L. Page et al., p. 323~336, American Society of Agronomy, Inc., Publisher, Madison, U. S. A. (1982)
- 2) Blaylock, M. J. and James, B. R. : Redox transformations and plant uptake of selenium resulting from root-soil interactions. *Plant Soil*, **158**, 1~12 (1994)
- 3) Ebbs, S. D. and Kochian, L. V. : Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species. *J. Environ. Qual.*, **26**, 776~781 (1997)
- 4) Glass, D. J. : Economic potential of phytoremediation ; in *Phytoremediation of Toxic Metals*, ed. I. Raskin and B. D. Ensley, p. 15~31, John Wiley & Sons, Inc., New York (2000)
- 5) 長谷川周一：保水性，土壤環境分析法，土壤環境分析法編集委員会編，p. 50，博友社，東京（1997）
- 6) Huang, J. W., Blaylock, M. J., Kapulnik, Y. and Ensley, B. D. : Phytoremediation of uranium-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2004~2008 (1998)
- 7) Huang, J. W., Chen, J. J., Berti, W. R. and Cunningham, S. D. : Phytoremediation of lead-contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 800~805 (1997)

- 8) 直原 毅：重金属汚染の現場における対応と問題点，土壤の有害金属汚染，日本土壤肥料学会編，p. 76～79，博友社，東京 (1991)
- 9) Kitagishi, K. and Yamane, I.: Heavy Metal Pollution in Soil of Japan, 302 pp., Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1981)
- 10) Lasat, M. M., Fuhrmann, M., Ebbs, S. D., Cornish, J. E. and Kochian, L. V.: Phytoremediation of a radiocesium-contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, **27**, 165～169 (1998)
- 11) 中野政詩・宮崎 毅・塩沢 昌・西村 拓：土壤物理環境測定法，p. 59～60，東京大学出版会，東京 (1995)
- 12) Quartacci, M. F., Cosi, E. and Navari-izzo, F.: Uptake and translocation of cadmium in Brassicaceae. *Minerva Biotech*, **13**, 97～101 (2001)
- 13) 新城明久：[新版] 生物統計学入門，p. 46～83，朝倉書店，東京 (1996)
- 14) 谷山鉄郎：地球環境保全概論，p. 84～85，東京大学出版会，東京 (1991)
- 15) Wada, K. and Harada, Y.: Effects of salt concentration and cation species on the measured cation-exchange capacities of soils and clays ; in Proc. Intern. Clay Conf., Tokyo, 1969, Vol. 1, p. 561～571 (1969)

### Effect of EDTA on Phytoremediation of Copper-Polluted Soils

Hiromichi Inoue, Kazutoshi Saeki and Jiro Chikushi  
(*Biotron Inst., Kyushu Univ.*)

The efficiency of additive agents to remove copper from Cu-mixed soils by *Brassica juncea* and *Zea mays* L. was studied. The plants were grown in decomposed granite soil (Regosol) and volcanic ash soil (Andosol) for 3 weeks. To simulate actually contaminated soil, copper contents of 25 and 250  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  were prepared for Regosol and Andosol, respectively. EDTA was found to be an excellent additive agent to raise the availability of Cu in soils. The effect of EDTA on Cu absorption by plants was limited in Regosol. On the other hand, in Andosol the Cu accumulation in shoot in *Z. mays* for the 100 mM EDTA treatment was 3.7 times larger than that for the 0 mM EDTA treatment. The Cu absorption by *B. juncea* was not affected by the EDTA addition to Andosol. It was observed that the effect of EDTA on Cu absorption into the vegetable parts fluctuated not only with EDTA concentration, but also with plant species.

*Key words* *Brassica juncea* Coss. (Indian mustard), copper amended soil, EDTA, phytoremediation, *Zea mays* L. (corn)

(*Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **74**, 169-174, 2003)