

氏名	EVI KURNIATI
授与学位	博士(工学)
学位記番号	理工博甲第644号
学位授与年月日	平成26年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
研究科, 専攻の名称	理工学研究科(博士後期課程) 環境共生系専攻
学位論文題目	Bioremediation of Mercury Contaminated Soil using <i>Aspergillus flavus</i> strain KRP1
論文審査委員	主査 山口大学 教授 今井 剛 山口大学 教授 関根 雅彦 山口大学 教授 新苗 正和 山口大学 教授 樋口 隆哉 山口大学 准教授 通阪 栄一

【学位論文内容の要旨】

Heavy metal presence in agricultural soil might be caused by long use of fertilizer, pesticides, as well as polluted water for irrigation. Mercury contamination in agricultural soil is generally due to application of municipal wastewater and industrial effluent for crop irrigation. Those might drive to its absorption by plant which is caused dangerous if it consumed by human or livestock. Fungi are known to tolerate and detoxify metals by several mechanisms including valence transformation, extra and intracellular precipitation and active uptake in associated with the production of antibiotics, enzymes and organic acid which is drive to future application for metal remediation from soil.

This research aims to observe the capability of filamentous fungi isolated from forest soil for bioremediation of mercury contamination. Six fungal strains were selected based on their capability to grow in 25 mg/L Hg^{2+} -contaminated potato dextrose agar plates. Fungal strain KRP1 showed the highest ratio of growth diameter, 0.831, thus was chosen for further observation. Identification based on colony and cell morphology carried out by 18S rRNA analysis gave a 98% match to *Aspergillus flavus* strain KRP1. The fungal characteristics in mercury(II) contamination such as range of optimum pH, optimum temperature and tolerance level were 5.5-7 and 25-35 °C and 100 mg/L respectively. The concentration of mercury in the media affected fungal growth during lag phases.

The fungal strain was also evaluated in vitro for the potential use in bioremediation of soil contaminated with mercury through observation of the growth profile and the mercury concentration in culture medium. The growth profiles of *Aspergillus flavus* strain KRP1 showed considerable growth in culture medium containing mercury. This result was supported by the decrease of mercury concentration which indicates a utilization process for mercury and might have mechanism for utilization. The capability of the fungal strain to remove the mercury(II) contaminant was evaluated in 100 mL sterile 10 mg/L Hg^{2+} -contaminated potato dextrose broth media in 250 mL Erlenmeyer flasks inoculated with 10^8 spore/mL fungal spore suspension and incubation at 30°C for 7 days. The mercury(II) utilization was observed for flasks shaken in a 130 r/min orbital shaker (shaken) and non-shaken flasks (static) treatments. Flasks containing contaminated media with no fungal spores were also provided as control. All treatments were done in triplicate. The strain was able to remove 97.50% and 98.73% mercury from shaken and static systems respectively. *A. flavus* strain KRP1 seems to have potential use in bioremediation of aqueous substrates containing mercury(II) through a bio sorption mechanism.

Plants are originally known to have capability to uptake heavy metals from contaminated sites through phytoremediation. This process is potentially noxious if the plant is a consumed plant because it will lead to bio-magnification mainly in case of mercury contamination. The results showed that the presence of mercury contaminant affected the total number of microbe yet tend to decrease the mercury contaminant from soil. The presence of plant itself is possible to remove mercury from soil as well as support the microbial growth resulted that combination between plant and fungal augmentation perform better in mercury removal from soil. In case of bioremediation, the selection of plant species is important either for better remediating performance or avoiding bio-magnification of mercury on food chain.

【論文審査結果の要旨】

水銀による土壤汚染は現在も大きな環境問題の1つである。特に、発展途上国では安価で簡便な汚染土壤からの水銀除去手法の開発が喫緊の課題である。水銀に汚染された土壤からの水銀除去の手法としては、微生物を用いたバイオレメディエーションが有効な手段の一つである。微生物によるバイオレメディエーションは水銀等の汚染物に耐性を持つ微生物を用いて汚染対象物を濃縮・除去するもので、植物と組み合わせることでよりその効果が向上することも知られている。バイオレメディエーションに適用する微生物としては、これまでは細菌類が多く適用されてきたが、近年菌類の有用性が注目されている。そこで、本研究では熱帯土壤から水銀のバイオレメディエーションに適する菌類をスクリーニングし、その特性を把握した上で、そのバイオレメディエーションへの利用可能性を実験的に検討した。

本論文の構成と内容は以下の通りである。

第1章では、研究の背景、目的および論文の構成について述べている。

第2章では、従来の研究についてまとめた。

第3章では、微生物の多様性が極めて豊かな熱帯における森林土壤を対象に、水銀に対する耐性を持つ菌類のスクリーニング（菌類のバイオレメディエーションへの利用可能性を把握するための実験的検討）を行った。スクリーニングされた複数の候補の中から、水銀に汚染された土壤のバイオレメディエーションに適するものを選定したところ、スクリーニングされた菌類は6種類で、その中から最も水銀に対する耐性の高かったコード番号 KRP1 を選定した。次に選定された KRP1 に対して、形態学的な検討から *Aspergillus* 属であることが明らかとなり、さらに分子生物学的手法を用いた解析により、*Aspergillus flavus* strain KRP1 であると同定された。

第4章では、同定された菌類の特性を実験的に把握した。実験結果から *Aspergillus flavus* strain KRP1 の水銀の混入された培地を用いた場合の最適増殖条件は pH が 5.5~7.0 の範囲で、温度が 25~35℃の範囲であることが明らかとなった。また、*Aspergillus flavus* strain KRP1 の水銀の最大耐性濃度は 100mg/L であることがわかった。

第5章では、*Aspergillus flavus* strain KRP1 のバイオレメディエーションへの利用可能性を実験的に検討した。実験結果から *Aspergillus flavus* strain KRP1 は水銀に対するバイオソープション（生物吸着）の能力が高いことが実験的に示された。さらに、植物と共存させることで土壤からの水銀除去の効果がより向上することが明らかとなった。

以上から、*Aspergillus flavus* strain KRP1 のバイオレメディエーションへの利用可能性が示されたと考えられる。

第6章の結論では、本論文を総括しその成果と今後の研究課題について述べている。

公聴会には、学内外から44名の参加があり、活発な質疑応答がなされた。公聴会での主な質問内容は、①ファイトレメディエーションと組み合わせる場合に植物の役割は何か、②ファイトレメディエーションと組み合わせる場合の実験方法をより詳しく説明すべきではないか、③*Aspergillus flavus* strain KRP1の最大水銀耐性濃度は100mg/Lとのことであるが、実用上はこの濃度で十分か、④植物のみのファイトレメディエーションだけでなく、なぜ*Aspergillus flavus* strain KRP1を組み合わせる必要があるのか、⑤植物による水銀の大気放出は安全といえるのか、⑥水銀を収着除去した後にどのように処理するのか、など多数であった。

以上のいずれの質問に対しても発表者からの的確で具体的な回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性および完成度ともに非常に優れており、博士（工学）の学位論文に十分値するものと判断した。