

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710014

研究課題名(和文) 腐植酸の吸着と生分解が相互作用したベンゾピレンの生物毒性に及ぼす影響

研究課題名(英文) The Effect of Sorption and Biodegradation of Humic Acids on Toxicity of Benzo[a]pyrene

研究代表者

柳 由貴子 (Yanagi, Yukiko)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：20412819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ベンゾ[a]ピレン(BaP)の異なる土壌由来腐植酸に対する吸着特性と腐植酸との相互作用によるBaPの藻類生育阻害率の変化を検討した。その結果、腐植酸の種類によりその程度は異なったが、腐植酸濃度に伴いBaPの吸着量は増大し、藻類生育阻害率は低下する傾向が認められ、腐植酸への吸着によりBaPの急性毒性は軽減することが示唆された。さらに、HAと吸着させたBaPをlaccaseによる生分解処理をした場合、藻類生育阻害率はBaP単体の場合と大きく異なり極めて低い値を示し、腐植酸と相互作用したBaPは生分解を受ける際も単体の場合と異なる毒性挙動を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effect of several soil humic acids on the sorption affinity and the acute toxicity to algae of benzo[a]pyrene (BaP) were examined. The sorption amount increased and the acute toxicity decreased with increasing concentration of the humic acids. It was suggested that the decreasing in the acute toxicity of BaP depended on the sorption of the BaP to humic acids. After the BaP adsorbing to the humic acid had been degraded by laccase, the acute toxicity of it was significantly lower value than that of BaP alone degraded by laccase. It was suggested that the BaP interacting with humic acid showed the different toxicity dynamics between BaP alone during biodegradation.

研究分野：土壤化学

キーワード：腐植酸 ベンゾ[a]ピレン 急性毒性 吸着 生分解

1. 研究開始当初の背景

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、アメリカ環境保護局では16種のPAHsが「priority pollutants」として指定され、我国では環境省の「化学物質の環境リスク評価」の対象物質となっている。このようなPAHsの環境リスク評価や汚染除去法を確立するためには、詳細な挙動の把握が要求されており、国内外において多くの研究により環境中におけるPAHsの存在量や存在形態、生物毒性について検討が行われてきている。

このようなPAHsに対して土壌の無機鉱物や主要有機態炭素である腐植物質 (HS) は相互作用して結合体を形成することで、各地の土壌におけるPAHsの顕在化に強く関与していると考えられている。さらにHSは、疎水性であるPAHsの溶解性に変化を及ぼし、水環境への拡散、生物作用の受けやすさにも影響を与える。従ってPAHsの挙動にHSが及ぼす影響は多大であり、HSとPAHsとの相互作用研究が注目されている。また、PAHsの生物毒性についてはHSと相互作用することにより変異原性が低下することが報告されている。しかしながら、このようなHSと生物毒性の関係についての研究例はわずかである。

また、HSは土壌微生物により分解を受けることが知られているが、HSと相互作用した後のPAHsがHS生分解により毒性をどのように変化させるかということについては全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PAHsの環境影響に及ぼすHSの影響を明らかにするために、HSとの収着ならびに収着した後のHSの生分解がPAHsの生物毒性に及ぼす影響を評価することである。PAHsとしてベンゾ[a]ピレン (BaP)、HSとして主要画分である腐植酸 (HA) を用いた溶液内モデルによるBaPとHAの収着試験をおこない、その収着特性把握する。さらに藻類を用いた生育阻害試験を行うことで、HSとの相互作用によるBaPの急性毒性変化を検討する。さらに、BaPと相互作用したHA

(BaP-HA) をlaccaseによる生分解に供試した後、藻類生育阻害試験に供試してその毒性変化を検討する。

これらのことから、HAによる収着ならびにHA分解がBaPの生物毒性をどのように変化させるかを考察する。

3. 研究の方法

(1) HAの精製と特性解析法

褐色森林土 (HO, NOF)、泥炭土 (IJ, TMT)、黒ボク土 (SG, NGO) 各2点からIHSS法に準じて粉末HA試料を抽出、精製した。得られた粉末HA試料については、液体¹³C NMR

分析により、官能基炭素割合を算出した。さらに、乾式燃焼法による元素分析を行い、C, H, N, O含量を算出した。

(2) 回分式収着試験によるBaPのHAへの収着特性検討法

蛍光消光法を利用した回分式収着試験によりBaPとHAの収着特性を検討した。すなわち、炭酸緩衝液 (pH 7.5) 10ml 中でBaP (0.1 mg L⁻¹) とHA (0~1.70 mg C L⁻¹) を混合し、24時間振とう後、蛍光強度を測定 (25°C, Ex: 380nm, Em: 405nm) した。得られたHA未添加区の蛍光強度 (F₀) とHA添加区の蛍光強度 (F) から、蛍光強度比 (F₀/F) を算出し、HA C濃度に対するF₀/Fをプロット (Stern-Volmerプロット) することによって回帰直線の傾きである収着係数 (K_{oc}) を算出した。

(3) BaPの急性毒性発現に対するHAの影響検討法

検定藻類として *Pseudokirchneriella subcapitata* NIAS-35 株 (N-35) を用いた藻類生育阻害試験によりBaPの急性毒性発現に対するHAの影響を検討した。すなわち、NIES C培地 (pH 7.5) 10ml にBaP (2.5 mg L⁻¹) とHA (0~1.22 mg C L⁻¹) を加えて、24h、25°Cで振とう後、N-35を1×10⁴ cells/mlとなるように接種した。4日間培養 (16h日長, 25°C, 130 rpm) 後、セルカウンターを用いてN-35の細胞数をカウントし、BaP未接種区に対する生育阻害率を算出した。得られた生育阻害率をHA濃度に対してプロットした際の直線的に低下する範囲での傾きを生育阻害低下係数 (K_{reg}) として算出した。

(4) laccaseによる生分解後のBaP-HAの急性毒性変化ならびに構造特性変化の検討法

NIES C培地 (pH 7.5) 10ml にBaP (2.5 mg L⁻¹) とHA (1.40 mg C L⁻¹) を加えて25°C, 24h振とうした後、laccase (*Trametes versicolor* 由来) を0, 40, 56 mg L⁻¹の濃度となるように添加して、25°C, 24h振とう培養を行った。この培養液中に前述(3)と同様にN-35を接種、培養した後、細胞数をカウントして生育阻害率を算出した。また、BaP-HAのLaccaseによる生分解による特性変化の検討のために三次元蛍光分析を行った。すなわち、上述に準じてBaPとHAを反応させたNIES C培地にlaccase (56 mg L⁻¹) を添加して24h, 25°Cで反応を行った。この反応液の三次元蛍光スペクトル分析 (25°C; Ex: 200~400nm, Em: 210~650nm; バンド幅5nm; PMT電圧400v) を行った。

4. 研究成果

(1) HAの構造特性

精製した粉末 HA 試料の官能基炭素割合を表 1 に、元素組成を表 2 に示す。褐色森林土 HA は 2 種類とも比較的類似した官能基炭素割合を示し、高い脂肪族炭素割合 (C_{Al}) と炭水化物炭素割合 (C_{oMe})、低い芳香族炭素割合 (C_{Ar}) と芳香族度を示した。また、高い H 含量、H/C と低い O/H を示した。一方、黒ボク土では、SG は低い C_{Al} 、H 含量、H/C と高い C_{Ar} 、O/C と芳香族度を示し典型的な黒ボク土の特性を示したが、NGO は褐色森林土と SG の中間的な性質を示した。これは、NGO が森林植生であることが影響していると考えられる。また、泥炭土ではフェノール性水酸基の結合した炭素割合 (C_{Ph}) が高く、N 含量が低く泥炭土の典型的な特性を示した。しかしながら、IJ と TMT では C_{Al} と C_{Ar} 、カルボキシル基炭素割合 (C_{COO})、カルボニル炭素割合 (C_{CO})、O 含量は大きく異なった。これは、由来する泥炭構成植物種の違いが影響を及ぼしたと考えられる。

表 1 HA の官能基炭素割合及び芳香族度, Koc, Kreg

	官能基炭素割合 (%)					
	C_{Al}	C_{oMe}	C_{Ar}	C_{Ph}	C_{COO}	C_{CO}
HO	24.8	25.7	23.5	5.3	17.7	3.0
NOF	22.2	30.3	22.8	6.1	15.6	3.0
IJ	17.7	16.1	42.4	11.4	10.9	1.5
TMT	11.7	16.7	33.2	10.0	21.5	6.8
NGO	11.7	23.3	33.8	7.7	18.5	4.9
SG	6.4	11.6	52.9	5.3	19.6	4.2

	芳香族度	$Koc \times 10^{-6}$	Kreg
HO	0.36	1.59	-41.3
NOF	0.35	4.77	-50.2
IJ	0.61	1.65	-65.5
TMT	0.60	2.51	-25.5
NGO	0.54	14.75	-109.2
SG	0.76	27.89	-156.4

芳香族度: $(C_{Ar} + C_{Ph}) / (C_{Al} + C_{oMe} + C_{Ar} + C_{Ph})$

表 2 HA の元素組成および原子数比

	元素組成 (weight %)			
	C	H	N	O
HO	57.2	6.1	4.6	32.1
NOF	53.3	5.2	4.3	37.2
IJ	58.7	4.7	2.0	34.6
TMT	56.2	4.5	1.7	37.6
NGO	53.6	4.1	3.7	38.5
SG	56.4	3.7	3.4	36.5

	原子数比			
	H/C	O/C	N/C	O/H
HO	1.28	0.42	0.07	0.33
NOF	1.18	0.52	0.07	0.45
IJ	0.96	0.44	0.03	0.46
TMT	0.96	0.50	0.03	0.52
NGO	0.92	0.54	0.06	0.58
SG	0.79	0.49	0.05	0.61

(2) BaP と HA の収着特性

いずれの HA についても、HA 濃度の増大とともに BaP の蛍光強度は減少し、HA 量に伴う BaP の収着量の増大が確認された。また、得られた蛍光強度から算出した Stern-Volmer プロットを図 1 に示す。いずれの HA についても直線性を示したが、その傾きは HA によって異なった。このプロットの傾きから算出した Koc (表 1) は、 $1.6 \sim 27.9 \times 10^6 \text{ L kg}^{-1}$ の範囲であり $SG > NGO > NOF > TMT > IJ, HO$ の順を示した。これらのことから、BaP は黒ボク土由来 HA に対する収着性が高いことが示された。Koc と HA の各種構造パラメーターとの関係を検討したところ、H 含量と C_{Al} との間に負、また O/H との間に正の有意な相関 ($p < 0.05$) が示され、これらの構造が BaP の収着に関与している可能性が示唆された。

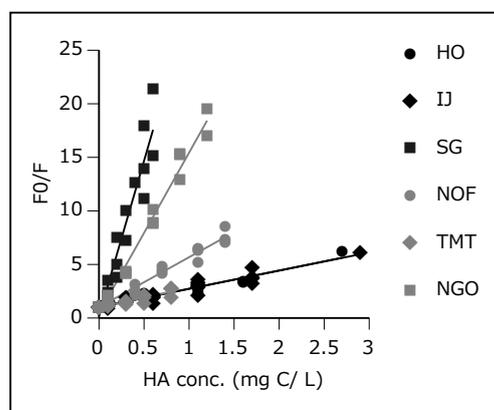


図 1 HA 濃度に対する BaP の蛍光強度比 (F_0/F) の Stern-Volmer プロット

(3) BaP の HA 収着による急性毒性の変化

HA を添加した藻類生育試験における BaP による生育阻害率を図 2 に示す。黒ボク土 HA では強い生育阻害の軽減効果が示されたのに対して、褐色森林土ではその効果は小さかった。しかしながら、いずれも HA 濃度の増大に伴い生育阻害率は低下した。一方、2 種類の泥炭土 HA では、HA 濃度の増大とともに生育阻害は低下したが、高い HA 濃度下では再び生育阻害率が增大する現象が認められ、他の土壌型由来 HA とは異なる傾向を示した。しかしながら、この現象の原因については明らかにはできなかった。また、直線性の得られた範囲での回帰直線の傾きである Kreg は $-25.5 \sim -156.4$ を示し (表 1)、これらは C_{Al} と Koc と有意な相関 ($p < 0.05$) を示した。さらに、傾向の異なる泥炭土 HA 2 点を除いた場合では、Koc ならびに Kreg ともに、上述のパラメーターのみならず C_{Ar} や芳香族度とも高い相関が認められた。従って、HA 添加による BaP による藻類生育阻害の軽減は BaP の HA 分子への収着により生じることが推察された。

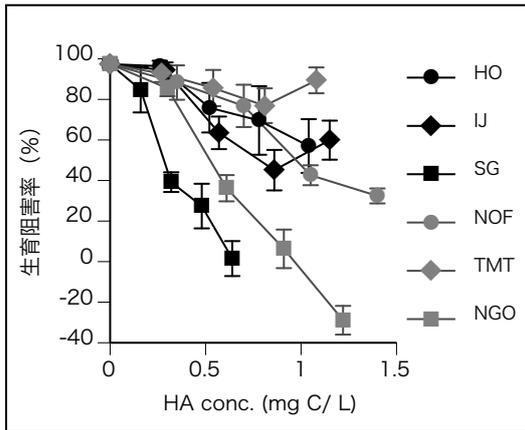


図2 各種 HA 添加による BaP の藻類生育阻害率の変化

(4) laccase による生分解後の BaP-HA の急性毒性および構造特性の変化

laccase 濃度に伴う BaP による藻類生育阻害率の変化を図 3 に示す。HA 未添加区では、laccase 濃度の増大に伴い直線的に生育阻害率は低下し、laccase 濃度 56 mg L^{-1} で 55% まで低下した。一方、HA 添加区では、HA 添加の影響により全体的に生育阻害率は低下したが、laccase 濃度 56 mg L^{-1} では -70% と極めて高い毒性軽減効果を示した。なお、この際の HA 分解の指標である褪色率は、27.7%であった。また、laccase 未添加ならびに添加時の BaP, BaP-HA の三次元蛍光スペクトルを図 4 に示す。laccase 添加により、Ex280nm, Em340nm 付近を中心とした laccase に起因するピークが顕著に出現した。BaP のみの場合は laccase 処理により Ex200 ~ 400nm, Em400 ~ 470nm 付近に広がる BaP に帰属されるピークのうち、Em がより長波長側のピーク強度がわずかに低下した。一方、BaP-HA の場合は、Ex350 ~ 400nm 付近のピークが顕著に減少し、HA に帰属すると推察される長波長域に広がるブロードなピーク形状の変化が認められた。従って、laccase により BaP-HA の生分解による極めて強い生育阻害効果軽減効果は BaP の分解のみならず BaP-HA 全体の構造変化が起因している可能性が示唆された。

腐植物質の分解を引き起こす酸化還元酵素系は BaP や他の PAHs の分解・無害化を引き起こすことは多くの報告があるが、本研究により HS と収着した状態では単体の状態とは異なる変化を引き起こすことが初めて示唆された。本研究では詳細な構造変化やメカニズムの解明には至らなかったが、今後のリスク評価には、PAHs 単体のみならず PAHs-HS 複合体の挙動についても考慮する必要があると考えられる。今後は、他種の HA, 酵素, 微生物を用いた現象の把握や、より詳細な構造特性変化の解析を行うこと

によるメカニズムの解明を予定している。

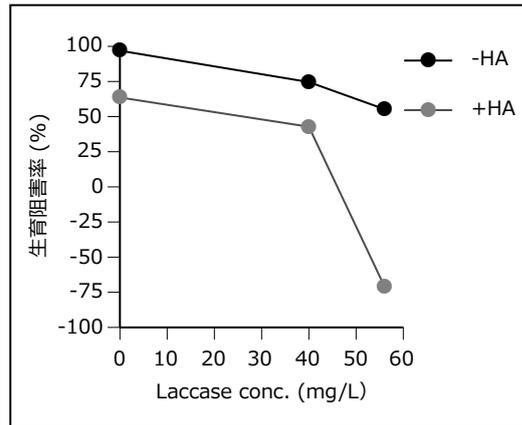
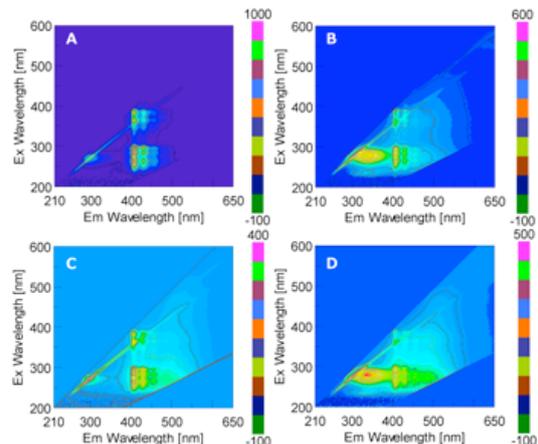


図3 laccase 濃度に伴う BaP による藻類生育阻害率の変化
-HA: HA 未添加区, +HA: HA 添加区

図4 BaP ならびに BaP-HA の三次元蛍光



光スペクトル

A : BaP, B : laccase 処理後の BaP,
C : BaP-HA, D : laccase 処理後の BaP-HA

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Y. Yanagi, Y. Okuyama, Y. Ochi, N. Fujitake, T. Kobayashi
Effect of humic acids on the acute toxicity of benzo[a]pyrene to algae, *Pseudo-kirchneriella subcapitata*. Book of Abstracts, The 17th Meeting of the International Humic Substances Society, vol. 1, 214-215, 2014. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) 小林孝行, 柳由貴子, 隅田裕明
ピレンの親和性に及ぼす腐植酸の化学構造特性の影響. 日本土壌肥料学会, 2014 年 9 月 9 日 ~ 9 月 11 日, 東京農工大学 (東京都小金井市)

(2) 柳由貴子, 奥山裕佳, 越智雄史, 藤嶽暢英, 小林孝行

Effect of humic acids on the acute toxicity of benzo[a]pyrene to algae, *Pseudo-kirchineriella subcapitata*. International Humic Substances Society, 2014年9月1日~9月5日, イオアニア (ギリシャ)

(3) 柳由貴子, 奥山裕佳, 藤嶽暢英, 小林孝行

ベンゾ[a]ピレンの生物毒性に対する腐植酸の影響 -緑藻に対する生育阻害軽減効果-. 日本腐植物質学会, 2013年11月21日~11月22日, 佐賀大学 (佐賀県佐賀市)

(4) 小林孝行, 柳由貴子, 藤嶽暢英, 隅田裕明

腐植酸寒天培地を用いた有機汚染物質のバイオアッセイ. 日本土壌肥料学会, 2013年9月11日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳 由貴子 (YANAGI YUKIKO)

山口大学農学部・助教

研究者番号: 20412819